PCT

世界知的所有権機關 際 事 務 局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6

C12N 15/12, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28

(11) 国際公開番号

WO99/46378

(43) 国際公開日

1999年9月16日(16.09.99)

(21) 国際出願番号

PCT/JP99/01191

JP

A1

(22) 国際出願日

1999年3月11日(11.03.99)

(30) 優先権データ

特願平10/60245 特願平11/26774 1998年3月12日(12.03.98)

1999年2月3日(03.02.99)

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 山之内製薬株式会社

(YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo, (JP)

(72) 発明者;および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)

松本光之(MATSUMOTO, Mitsuyuki)[JP/JP]

杉本 貫(SUGIMOTO, Toru)[JP/JP]

高崎 淳(TAKASAKI, Jun)[JP/JP]

蒲原正純(KAMOHARA, Masazumi)[JP/JP]

斉藤 哲(SAITO, Tetsu)[JP/JP]

〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21

山之内製薬株式会社内 Ibaraki, (JP)

小林正人(KOBAYASHI, Masato)[JP/JP]

〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号

山之内製薬株式会社内 Tokyo, (JP)

(74) 代理人

弁理士 長井省三,外(NAGAI, Shozo et al.)

〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号

山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユー ラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)

添付公開書類

国際調査報告書

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEINS

(54)発明の名称 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質

(57) Abstract

Regarding the field of genetic engineering, novel G protein-coupled receptor family proteins SREB1, SREB2 and SREB3 expressed in the central nervous system; genes encoding these proteins; and a screening method, etc., with the use of these proteins. An example f methods for acquiring such a G protein-coupled receptor protein as described above comprises effecting RT-PCR with the use of mRNA extracted from a human or rat brain tissue or cells originating in the brain as a template by employing two primers between which the whole translational region of the G protein-coupled receptor protein or a part thereof is sandwiched to thereby obtain cDNA of the G proteincoupled receptor protein or a part thereof and then integrating the cDNA into an appropriate vector followed by the expression thereof in host cells.

(57)要約

本発明は遺伝子工学の分野に属し、中枢神経系に発現している新規 なG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質SREB1、SREB 2 および S R E B 3、該蛋白質をコードする遺伝子、並びに、該蛋白 質を用いたスクリーニング法等を提供する。

本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質の取得方法の一つとして、 ヒトまたはラット脳組織あるいは脳由来細胞から抽出されたmRNA を鋳型として、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質翻訳領域の全体ま たは一部をはさむ2種類のプライマーを用い、RT-PCRを行うこ とにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAまたはその一 部を得、該cDNAを適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞で発 現させる方法が挙げられる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報) アラブ首長国連邦 アルバニア アルメニア ヘー・ファイン スウェーデンシンガポール スロヴェニア スロヴァキア ーストリア ーストラリア ブルギナ・ファソ ブルガリア B J B R B Y トーコー タジキスタン タンザニア トルクメニスタン ベラルーシ カナダ 中央アフリカ MR MW トジポアー STPE ヴィェトナム ユーゴースラピア 南アフリカ共和国 ジンパブエ

オランダ ュー・ジーランド

1

明細書

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質

技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いたスクリーニング法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体、該抗体を用いたスクリーニング法に関するものである。

背景技術

三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜レセプター群は「G蛋白質共役型レセプター」と総称されている。現在まで知られている全てのG蛋白質共役型レセプターはアミノ末端を細胞外、カルボキシル末端を細胞内とし、細胞膜を7回貫通する構造を共有するスーパーファミリーを形成していることから「7回膜貫通型レセプター」と総称される場合もある。G蛋白質共役型レセプターは様々な生理活性物質の情報を、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型 GTP 結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介する cAMP、フォスフォリパーゼ C を介する Ca⁺⁺などがよく知られているが、三量体型 GTP 結合蛋白質を介したチャネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかとなってきた(Gudermann, T. et al. (1997) Annu. Rev. Neurosci., 20, 399-427)。G蛋白質共役型レセプターを介して情報を伝達する生理活性物質の中には、神経伝達物質、ホルモン、ケモカイン、脂質由来の情報伝達物質、2 価イオ

ン、プロテアーゼなど既存の生理活性物質の多くが含まれる。これら生理活性物質には それぞれ特異的なG蛋白質共役型レセプターが存在し、その情報を細胞内に伝達する。

現在までに数百種類のG蛋白質共役型レセプターが真核生物からクローニングされている。ヒトに関しては百種類以上の内在性リガンドとの対応がとれたG蛋白質共役型レセプターがクローニングされており、これらが疾患に対する薬剤の標的となっている。G蛋白質共役型レセプターが標的となっている疾患は多岐にわたり、中枢神経系、循環器系、炎症免疫系、消化器系、運動器系、泌尿器生殖器系それぞれの分野でG蛋白質共役型レセプターに作用する有効な薬剤が存在する(Stadel, J. et al. (1997) Trends Pharmacol. Sci., 18, 430-437)。このことはG蛋白質共役型レセプターのアゴニスト或いはアンタゴニストが疾患の治療剤となる可能性が高いことを示唆し、そのため新たなG蛋白質共役型レセプターの発見、同定のための研究が盛んに行われている。

G蛋白質共役型レセプターはそのスーパーファミリー内での構造類似性から遺伝子のクローニングが先行する場合も多く、内在性リガンドとの対応がとれていないレセプターはオーファンG蛋白質共役型レセプターと呼ばれている。一般的にオーファンG蛋白質共役型レセプターは特異的なリガンドが発見されていないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーと高性能ハイスループットスクリーニングを組み合わせることで、オーファンG蛋白質共役型レセプターをターゲットとした薬剤の創製が提唱されている(Stadel, J. et al. (1997) Trends Pharmacol. Sci., 18, 430-437)。

すなわち、多くのG蛋白質共役型レセプターのセカンドメッセンジャーとなっている cAMP、 Ca⁺⁺の測定、或いは、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化の指標となる GTPase 活性、 GTP 7S のG蛋白質結合測定をハイスループット化することで化合物ライブラリーからオーファンG蛋白質共役型レセプターに対するアゴニストをスクリーニングすることが可能であり、その化合物を利用した特異的なアゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発が可能であるということである。このような状況下では、新しい疾患

の治療ターゲットとなり得る新規G蛋白質共役型レセプターの発見が、G蛋白質共役型レセプターに作用する薬剤創製の最も重要なステップと見なすことができる。

G蛋白質共役型レセプターでは、一つの内在性リガンドに対して複数のレセプターが存在する場合がある。このようなレセプター群はレセプターファミリーとよばれ、各々のレセプターはサブタイプと称される。全てのG蛋白質共役型レセプターは細胞膜を7回貫通する構造を共有するため、互いに独立したG蛋白質共役型レセプターでも膜貫通領域を中心に20-25%のアミノ酸が保存されているが、レセプターファミリーを形成している場合にはそのサブタイプ間で保存されているアミノ酸の割合が35%以上、特に関連が高いサブタイプ間では60-80%と有意に上昇する(Strader, C.D. et al. (1994) Annu. Rev. Biochem., 63, 101-132)。

レセプターファミリーが存在する内在性リガンドをターゲットとした疾患治療薬の開発を考える際には、サブタイプの特異性が重要となる場合が多い。通常、薬剤の主作用を介するサブタイプへの作用に対して、他のサブタイプへの作用は副作用につながることが多いためである。このためサブタイプ特異的なアゴニスト、或いはアンタゴニストの創製が望まれるが、そのためにはサブタイプの特異性を検出する手段が必要である。現在ではサブタイプの遺伝子をクローニングし、それを発現させた培養細胞系などを用いて特異性を検出する系を構築するという方法が一般的である。

新規なG蛋白質共役型レセプターを疾患治療のターゲットとする場合にもサブタイプ特異性が重要である可能性は高く、このため新規G蛋白質共役型レセプターにおいてもレセプターファミリーの発見は重要である。独立したG蛋白質共役型レセプター間ではアミノ酸配列のホモロジーは全体で20-25%であるが、レセプターファミリーを形成している場合、ファミリー内では通常ホモロジーが有意に上昇することから、二者のG蛋白質共役型レセプターのホモロジーを比較することで、それらがファミリーを形成しているかどうか推定することが可能である。これを利用することでファミリーを形成している新規G蛋白質共役型レセプターの発見も可能であり、新規G蛋白質共役型レセプターファミリーが発見された場

4

合は、サブタイプ特異的なアゴニスト及びアンタゴニストの創製が可能なことから疾患治療薬への道が更に拓けるものと考えられる。

中枢神経系は神経伝達物質に代表される生理活性物質を用いて様々な情報を伝達、制御している。その情報伝達および制御にG蛋白質共役型レセプターが重要な役割を果たしている。多くの種類のG蛋白質共役型レセプターが中枢神経系に存在しているため、それらは中枢神経系の疾患の重要な治療ターゲットとなっている。例えば、神経伝達物質ドーパミンのG蛋白質共役型レセプターは精神分裂病(Seeman, P. et al. (1997) Neuropsychopharmacology, 16, 93-110)、セロトニンのG蛋白質共役型レセプターは鬱病(Cowen, P. J. (1991) Br. J. Psychiatry, 159 (Suppl. 12), 7-14)、ニューロペプチド Y のG蛋白質共役型レセプターは摂食障害(Blomqvist, A. G. and Herzog, H. (1997) Trends Neurosci., 20, 294-298)の治療ターゲットであると考えられている。

中枢神経系で発現している新規なG蛋白質共役型レセプター、好ましくはヒト由来のレセプターは新たな中枢神経系の疾患の治療ターゲットの候補または中枢神経系の機能解明に繋がると考えられる。また、サブタイプ特異的な薬剤を開発するためには中枢神経系で発現している新規なG蛋白質共役型レセプターにおいてもファミリーを発見することが望ましい。本発明G蛋白質共役型レセプターの一つ SREB1 のアミノ酸配列に対してホモロジーが高いマウスから得られたレセプター GPR27 の遺伝子と、その遺伝子配列に基づくアミノ酸配列が報告されている(O'Dowd, B.F. et al. (1998) Genomics, 47, 310—313)が、ヒト由来のレセプターの遺伝子配列、アミノ酸配列は現時点では知られていない。

発明の開示

本発明は、中枢神経系に発現している新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質を中枢性疾患の治療薬剤の標的として提供することを課題とする。

在中国中国中国中国中国中国

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、中枢神経系に発現している新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーをコードする遺伝子(SREB1、SREB2、SREB3、rSREB1、rSREB3)を単離することに成功した。

また、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法を確立、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質及 び該G蛋白質共役型レセプター蛋白質活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスク リーニングを可能とした。

具体的には本発明は、

(1) 配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、

好ましくは配列番号: 2、4または6記載のアミノ酸配列を有しているヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは6、22または26記載のアミノ酸配列を有しているラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質であり、

- (2) 配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、
- (3) 前記(1)に記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子、
 - (4) 前記(3)記載の遺伝子を含むベクター、
 - (5) 前記(4)記載のベクターを含む宿主細胞、
- (6) 前記(5)記載の宿主細胞を用いる前記(1)または(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、

- (7) 前記(1)または(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と被験化合物とを接触させ、当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質作用薬をスクリーニングする方法、または
- (8) 前記(1)または(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体に関する。

以下、本発明で使用される用語につき説明する。

「ヒト由来」または「ラット由来」とは、ヒトまたはラットで発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列であることをいう。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の「同効物」とは、配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質のいずれかと同一の活性を示す、中枢神経系に発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質をいう。

なお、G蛋白質共役型レセプターとG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、同義である。

本発明の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、それらの同効物なら何れでもよい。具体的には配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個、好ましくは1乃至10個、更に好ましくは1乃至7個、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸でアミノ酸の置換、欠失または挿入があるアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号: 2、4、または6記載のアミノ酸配列で示される蛋白質と同一の活性を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であれば本発明に包含される。好ましくは、ヒト由来又はラット由来の配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質である。

また、本発明の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する 遺伝子は、配列番号:2、4、または6記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセ プター蛋白質、あるいは、それらの同効物をコードする塩基配列を有する遺伝子なら何れ でもよい。好ましくは、配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子である。さらに好ましくは、配列番号:1記載の塩基配列の1番目から1125番目、配列番号:3記載の塩基配列の1番目から1110番目、配列番号:5記載の塩基配列の1番目から1119番目、配列番号:21記載の塩基配列の1番か目ら1131番目、配列番号:23記載の塩基配列の1番目から1110番目、又は配列番号:25記載の1番目から1119番目を有する遺伝子である。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子は、以下の方法によって得ることができる。

1)新規G蛋白質共役型レセプター遺伝子の製造方法

a)第1製造法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生する能力を有するヒト細胞あるいは 組織から mRNA を抽出する。次いでこの mRNA を鋳型として該G蛋白質共役型レセプター蛋白質 mRNA または一部の mRNA 領域をはさんだ2種類のプライマーを作製する。 denature 温度、変性剤添加条件などを改良し、SREB1、SREB2、または SREB3 のそれぞれに適した逆転写酵素ーポリメラーゼ連鎖反応(以下 RT-PCR という)を行うことにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質 cDNA またはその一部を得ることができる。さらに、得られたG蛋白質共役型レセプターcDNA またはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該レセプター蛋白質を製造することができる。

まず、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織、例えばヒト脳またはラット脳から該蛋白質をコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネートーグアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織は、該蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザン ブロッティング法、該蛋白質に特異的な抗体を用いたウエスタン ブロッティング法などにより特定することができる。

mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば mRNA をオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA をさらに分画することもできる。 また、mRNA を抽出せずとも、市販されている抽出済 mRNA を用いても良い。

次に、精製された mRNA をランダムプライマー又はオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第1鎖 cDNAを合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第1鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いて PCR に供し、目的とする新規G蛋白質共役型レセプターDNA を増幅する。得られた DNA をアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記 DNA を制限酸素等で切断し、接続することによって目的とする DNA 断片を得ることもできる。

b)第2製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法の他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得た mRNA を鋳型として逆転写酵素を用いて1本鎖 cDNA を合成した後、この1本鎖 cDNA から2本鎖 cDNA を合成する。その方法としてはS 1ヌクレアーゼ法(Efstratiadis, A. et al. (1976) Cell, 7, 279-288)、Land 法(Land, H. et al. (1981) Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266)、O. Joon Yoo 法(Yoo, O. J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053)、Okayama-Berg 法(Okayama, H. and Berg, P. (1982) Mol. Cell. Biol., 2, 161-170)などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大陽菌、例えば DH5 α株に導入して形質転換させて、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性を指標として組換体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大陽菌の場合にはHanahan の方法(Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol., 166, 557–580)、すなわち CaCl₂や MgCl₂ または RbCl を共存させて調製したコンピテント細胞に該組換え DNA 体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の DNA を有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

① 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し(この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ(32P 又は33P で標識する)として、形質転換株の DNA を変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索して、これを選択する。

② ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応(Saiki, R. K. et al. (1988) Science 239, 487-491)を行い、目的のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の全部又は一部をコードする DNA 断片を増幅する。ここで用いる鋳型 DNA としては、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生する細胞の mRNA より逆転写反応にて合成した cDNA、またはゲノム DNA を用いることができる。このようにして調製した DNA を断片を 32P 又は 33P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

③ 他の動物細胞で新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生させてスクリーニング する方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし (この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の 染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい)、遺伝子にコードされた蛋白 を細胞表面に産生させる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用 いて該蛋白質を検出することにより、元の形質転換株より目的のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA を有する株を選択する。

- ④ 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて選択する方法 あらかじめ、cDNA を発現ベクターに組込み、形質転換株表面で蛋白を産生させ、本発 明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体および該抗体に対する2次抗体を用 いて、所望のG蛋白質共役型レセプター蛋白質産生株を検出し、目的の株を選択する。
 - ⑤ セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られる cDNA を、ニトロセルロースフィルター等にブロットし本発明の G蛋白質共役型レセプター蛋白質産生細胞からの mRNA をハイブリダイズさせた後、 cDNA に結合した mRNA を解離させ、回収する。回収された mRNA を蛋白翻訳系、例えば アフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等 の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA を採取する方法は、公知の方法(Maniatis, T. et al.(1982): Molecular Cloning—A Laboratory Manual "Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従い実施できる。例えば細胞よりプラスミド DNA に相当する画分を分離し、該プラスミド DNA より cDNA 領域を切り出すことにより行ない得る。

c)第3製造法

配列番号: 2、4、6、22、または26で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子は、化学合成法によって製造した DNA 断片を結合することによっても製造できる。各 DNA は、DNA 合成機(例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer(Beckman 社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社)など)を用いて合成することができる。

d)第4製造法

本発明の遺伝子を利用して遺伝子工学的手法により得られる物質が本発明のG蛋白 質共役型レセプター蛋白質機能を発現するためには、必ずしも配列表 配列番号:2、4、 6、22、または26に示されるアミノ酸配列のすべてを有するものである必要は無く、例え ばその一部の配列であっても、あるいは他のアミノ酸配列が付加されていても、それが配 列番号:2、4、6、22、または26に示されるアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセ プター蛋白質と同一の活性を示す限り、それらの蛋白質もまた本発明のG蛋白質共役型 レセプター蛋白質に包含される。また、一般に真核生物の遺伝子はインターフェロン遺伝 子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を示すと考えられ(例えば、Nishi, T. et al. (1985) J. Biochem., 97, 153-159 を参照)、この多型現象によって1または複数個の アミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の変化はあってもアミノ酸は全く変 わらない場合もある。したがって、配列番号:2、4、または6で示されるアミノ酸配列の中 の1もしくは複数個の部位において、1もしくは複数個のアミノ酸残基が置換、失欠、また は挿入されている蛋白質でも配列番号:2、4、または6記載のアミノ酸配列で示されるG 蛋白質共役型レセプターと同一の活性を有していることがありえる。これらの蛋白質は、 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の同効物と呼び、本発明に含まれる。また、 配列番号: 22、24、または26で示されるラット由来アミノ酸配列を有するG蛋白共役型レ セプター、または当該レセプターと同一の活性を有しているG蛋白共役型レセプターも同 効物に包含される。

これらの本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の同効物をコードする塩基配列を有する遺伝子はすべて本発明に含まれる。このような各種の本発明の遺伝子は、上記本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al.(1984) Nature, 10, 105-111)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham, R. et al.(1981) Nucleic Acids Res.,9 r43-r74)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific

mutagenesis)(Mark, D. F. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666)等に従うことができる。

以上、a)乃至d)により得られる DNA の配列決定は、例えばマキサムーギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980): Methods in Enzymology "65, 499-559)やM13を用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J (1982) Gene, 19, 269-276)等により行うことができる。

また、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、下記の方法によって得ることができる。

2) 本発明のG蛋白質共役型レセプターの組み換え蛋白質の製造方法

単離された本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクターDNA に再び組込むことにより、他の真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞である COS 細胞(Gluzman, Y. (1981) Cell, 23, 175–182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A.(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216–4220)、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293–EBNA 細胞 (Invitrogen 社)等がよく用いられているが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol., 1,854-864)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF-BOS

(Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4(Invitrogen 社) 等を例示できるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama, K. and Takebe,Y. (1990) Med. Immunol., 20, 27-32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、pCDM8(Seed, B. (1987) Nature, 329, 840-842) 等が挙げられる。該発現ベクターは DEAEーデキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308)、リン酸カルシウムーDNA 共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology, 52, 456-457)、FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いた方法、および電気パスル穿孔法(Neumann, E. et al.(1982) EMBO J., 1, 841-845)等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo(Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual "Cold Spring Harbor Laboratory, NY)や pSV2-neo(Southern, P. J. and Berg,P. (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341)等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として293-EBNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4(Invitrogen 社)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞表面に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修正イーグル

最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換体の細胞内または細胞表面に生産される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、該レセプター蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、それらより分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えばレセプター蛋白質を含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、変析法、これらの組合せ等を例示できる。なお、膜分画は常法に従って得ることができる。例えば本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより得られる。また、できるだけ緩和な可溶化剤(CHAPS、Triton X-100、ジキトニン等)でG蛋白質共役型レセプター蛋白質を可溶化することにより、可溶化後もレセプターの特性を保持することができる。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質はマーカー配列とインフレームで融合して発現させることで、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現の確認、細胞内局在の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitope などがある。また、マーカー配列と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的な配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体と Hexa-Histidine tag とをトロンビン認識配列で連結した報告がある(Hayashi, M.K. and Haga, T. (1996) J. Biochem., 120, 1232-1238)

本発明にはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング法が包含される。該スクリーニング法は、前記により構築されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いて、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の生理学的な特性に応じたG蛋白質共役型レセプター蛋白質の修飾の指標を測定する系に被験薬を添加し、該指標を測定する手段を含む。該測定系は、具体的には、以下のスクリーニング方法が挙げられる。また、被験薬は従来G蛋白質共役型レセプターリガンド活性を有することは知られているが該新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性に対して選択的に修飾するか不明な化合物またはペプチド、あるいはケミカルファイルに登録されている種々のG蛋白質共役型レセプターリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術(Terrett, N.K., et al. (1995) Tetrahedron, 51, 8135-8137)によって得られた化合物群やファージ・ディスプレイ法(Felici, F., et al. (1991) J. M. I. Biol., 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用いうる。

- 3)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質にリガンド、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング方法
- a)リガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合する化合物、ペプチド及び抗体(総称してリガンド)はリガンド結合アッセイ法によりスクリーニングする事ができる。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品を調製し、リガンド結合アッセイ用に精製されたリガンドを放射性標識(50-2000 Ci/mmol)する。緩衝液、イオン、pHのようなアッセイ条件を最適化し、最適化したバッファー中で同レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品を放射性標識したリガンドと共に一定時間インキュベーションする。反応後、ガラスフィルター等で濾過し適量のバッフ

アーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する(全結合量)。放射性標識していないリガンドを上記反応液中に大過剰加えることにより非特異的結合量を測定し、全結合量から非特異的結合量を差し引くことにより特異的結合量がえられる。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品に対して特異的結合を示したリガンドを本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。また、得られた放射活性リガンドの結合阻害を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体、アンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体、アンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

b) GTP rS 結合法を利用したスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体はGTP γ S結合法によりスクリーニングすることが可能である(Lazareno, S. and Birdsall, N.J.M. (1993) Br. J. Pharmacol. 109, 1120–1127)。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜を 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM GDP 溶液中で、35S で標識された GTP γ S 400 pM と混合する。被検薬存在下と非存在下でインキュベーション後、ガラスフィルター等で濾過し、結合した GTP γ S の放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被検薬存在下における特異的な GTP γ S 結合の上昇を指標に、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による GTP γ S 結合上昇の抑制を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による GTP γ S 結合上昇の抑制を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による GTP γ S 結合上昇の抑制を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

c)細胞内 Ca⁺⁺および cAMP 濃度の変動を利用したスクリーニング方法

(图·波克·图·波克·克克·克克·克克·

多くのG蛋白質共役型レセプター蛋白質はアゴニスト刺激で細胞内の Ca⁺⁺の上昇および/またはcAMP 濃度の上昇または低下を引き起こす。ゆえに本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体は細胞内 Ca⁺⁺またはcAMP 濃度の変動を利用してスクリーニングすることが可能である。Ca⁺⁺濃度の測定はfura2 等を用い、cAMP 濃度の測定は市販の cAMP 測定キット(Amersham 社等)を用いて測定する。

また、Ca*および cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を検出することにより間接的に Ca*および cAMP 濃度を測定することが可能である。該レセプター蛋白質を発現させた細胞とレセプター蛋白質を発現させていない宿主細胞(コントロール細胞)に化合物、ペプチド、組織抽出物等を一定時間作用させ、Ca*および cAMP 濃度を直接あるいは間接的に測定する。コントロール細胞と比較して、該レセプター蛋白質を発現させた細胞特異的な Ca*の上昇および/または cAMP 濃度の上昇または低下を指標にアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による Ca*の上昇および/または cAMP 濃度の上昇または低下を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

d)マイクロフィジオメーターを用いたスクリーニング方法

細胞が様々なシグナル応答を行う場合、細胞外への微少な水素イオンの流出が検出される。この水素イオンの流出は、その大部分が、細胞が応答するためのエネルギーを得るための燃料消費で生ずる代謝産物の増加、または細胞のシグナルが直接水素イオンポンプに伝達する場合に生ずる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、そのシグナル伝達にエネルギーを必要とするため、レセプターの活性化の際には水素イオンの流出が起こる。CYTOSENSOR マイクロフィジオメーター(Molecular Devices 社)により、こ

のような細胞近傍の培地中の微少な水素イオンの流出による pH 変化が検出可能であることから、このようなエネルギーを消費する受容体の活性化の検出に利用できる。

該レセプター蛋白質を発現させた細胞とレセプター蛋白質を発現させていない宿主細胞(コントロール細胞)に化合物、ペプチド、組織抽出物等を一定時間作用させ、水素イオンの流出による pH 変化を測定する。コントロール細胞と比較して、該レセプター蛋白質を発現させた細胞特異的な水素イオンの流出による pH 変化を指標にアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による水素イオンの流出による pH 変化を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による水素イオンの流出による pH 変化を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

本発明には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質または前記スクリーニング法により選択されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を有意に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬が包含される。

本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、は各種動物に該新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質や該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法(Raz, E. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523; Donnelly, J. J. et al. (1996) J. Infect. Dis., 173, 314-320) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造された血清または卵からポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロティンAアガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')2、Fab、Fab'、Fv を得ることができる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法(Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Nature, 256, 495-497)により当業者が容易に製造することが可能である。

本発明 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞とと融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチンーグアニンーホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8.U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリーコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、RPMI-1640 などの通常よく用いられているものに適宜 10~30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株は HAT 選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA 法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で 2~4日間、あるいはプリスタンで前処理した BALB/c系マウスの腹腔内で 10~20 日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。

このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質 単離精製法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、 透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテ イン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。また、モノクローナル抗体ま たはその一部分を含む抗体断片は該抗体をコードする遺伝子の全部または一部を発現ベクターに組み込み、大腸菌、酵母、または動物細胞に導入して生産させることもできる。以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')2、Fab、Fab'、Fv を得ることができる。

さらには、本発明 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方法(Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352, 624-628; Zebedee, S. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179)により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス(Lonberg, N. et al. (1994) Nature, 368, 856-859) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

本発明医薬は、G蛋白質共役型レセプターの活性を選択的に制御する新規な薬理作用を有することを特徴としており、該医薬の用途としては該G蛋白質共役型レセプター活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患である中枢性疾患などが挙げられる。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質活性修飾化合物、ペプチド、抗体または抗体断片を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグ

ネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

図面の簡単な説明

図1は、SREB1、SREB2、及び SREB3 のアミノ酸配列のアラインメントを示す。

図2は、SREB1のヒト臓器についてのノーザン解析の結果を示す。

図3は、SREB1のヒト脳の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

図4は、SREB2のヒト臓器についてのノーザン解析の結果を示す。

図5は、SREB2のヒト脳の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

図6は、SREB3のヒト臓器についてのノーザン解析の結果を示す。

図7は、SREB3のヒト脳の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

図8は、SREB1、SREB2 または SREB3 蛋白質の発現を確認した結果を示す。

図9は、抗3LO抗体の SREB1、SREB2 または SREB3 に対する結合活性を示す。

図10は、抗C24抗体の SREB1 に対する結合活性を示す。

図11は、SREB1、SREB2 または SREB3 を導入した細胞における pCRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性を示す。

図12は、SREB1、SREB2 または SREB3 を導入した細胞における pSRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に具体的に開示するために、実施例を記載するが、本発明は実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法(Maniatis, T. at al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従って実施可能である。

(実施例1)新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質をコードする遺伝子の単離本発明のG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質(SREB1、SREB2 または SREB3)をコードする全長 cDNA は、ヒト脳由来の poly A+ RNA(Clontech 社)を template として RT-PCR により取得した。

新規G蛋白質共役型レセプターヒト SREB1 の増幅には forward primer として 5'-AAAATCTAGA CGCGATGGCGAACGCGAGCGA-3'(配列番号: 7)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA GTCTATGTGGCGGGGCCTCCC-3'(配列番号: 8)を用いた(それぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。RT-PCR は Pfu DNA polymerase(Stratagen 社)を用い 5% formamide 存在下で 98 ℃(20 秒) / 64 ℃(30 秒) / 74 ℃(3 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を Xbalで消化した後、pCEP4 plasmid(Invitrogen 社)を用いてクローニングした。pCEP4 plasmid

は、動物細胞において強力なプロモーター活性を示す CMV プロモーターを持っているので、動物細胞に組み換え蛋白質を発現させるのに使用できる。得られたクローンの塩基配列は dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer(Applied Biosystems 社)を用いて解析した。明らかになった配列を配列表配列表配列番号: 1に示す。

同配列は 1125 base の open reading frame(配列番号: 1の第 1 番目から第 1125 番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(375 アミノ酸)を配列表配列番号: 2に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型レセプターの特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

新規G蛋白質共役型レセプターヒト SREB2 の増幅には forward primer として 5'-AAAATCTAGA TCTATGGCGAACTATAGCCATGCA-3'(配列番号:9)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA AAGGCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3'(配列番号:10)を用いた(それぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。RT-PCR は Pfu DNA polymeras (Stratagene 社)を用い 96°C(20 秒) / 54°C(30 秒) / 74°C(3 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を Xbal で消化した後、pCEP4 plasmid(Invitrogen 社)を用いてクローニングした。 得られたクローンの塩基配列は dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer(Applied Biosystems 社)を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号:3 に示す。

同配列は 1110 base の open reading frame(配列番号:3の第1番目から第1110番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(370 アミノ酸)を配列表配列番号:4 に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型レセプターの特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

新規G蛋白質共役型レセプターヒト SREB3 の増幅には forward primer として 5'-AAAATCTAGA GTATGGCCAACACTACCGGAGAG-3'(配列番号: 11)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA CCTGTCTGCCTACCAGCCTGC-3'(配列番号: 12)を用いた(そ

れぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。RT-PCR は Pfu DNA polymerase (Stratagene 社)を用い 5% formamide 存在下で 98℃(20 秒) / 62℃(30 秒) / 74℃(3 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を Xbal で消化した後、pCEP4 plasmid(Invitrogen 社)を用いてクローニングした。 得られたクローンの塩基配列は dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer(Applied Biosystems 社)を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号:5 に示す。

同配列は 1119 base の open reading frame(配列番号:5の第1番目から第1119番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(373 アミノ酸)を配列表 配列番号:6 に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型レセプターの特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

新規G蛋白質共役型レセプターSREB ファミリー(SREB1、SREB2 または SREB3)と既存のG蛋白質共役型レセプターファミリーとのホモロジーはそれぞれアミノ酸配列で25%以下である。

一方、SREB1 と SREB2 のホモロジーは 52%、SREB1 と SREB3 のホモロジーは 52%、SREB2 と SREB3 のホモロジーは 63%と既存のG蛋白質共役型レセプターとのホモロジーに比べ有意に高い(図1)。このことは本発明のG蛋白質共役型レセプターSREB1、SREB2 または SREB3 が既存のG蛋白質共役型レセプターとは独立した新規なG蛋白質共役型レセプターファミリーを形成していることを示している。

(実施例2)組織におけるヒト新規G蛋白質共役型レセプターファミリー遺伝子の発現分布 Northern blot hybridization 法により本発明のG蛋白質共役型レセプター遺伝子の発現分布を解析した。ヒト SREB1 の probe には cDNA 断片(配列番号:1の第722番目から第1054番目)を用いた。ヒトの各臓器由来の poly A+ RNA(2 μg)をブロットしたメンブレン (Clontech 社)と prob の hybridization は 50% formamide、5 x SSPE、10 x Denhardt's 溶

液、2% SDS、100 μg/ml 変性サケ精子 DNA を含む溶液中で、42°C(18 時間)で行った。メンブレンは、最終的に 0.2 x SSC、0.1% SDS を含む溶液で2回(65°C、30分)洗浄した。ヒトの各臓器(心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球)について Northern 解析を行ったところ、図2に示すように 3 kb の mRNA が脳、卵巣、精巣、心臓、前立腺で、3 kb と 2.3 kb の mRNA が末梢血白血球で検出された。また、膵臓でも 3 kb のシグナルが若干検出された。さらに、ヒト脳の各領域(扁桃体、尾状核、脳梁、海馬、黒質、視床下核、視床、小脳、大脳皮質、延髄、脊髄、大脳皮質後頭葉、大脳皮質前頭葉、大脳皮質側頭葉、被殻)についても Northern解析を行った。本発明のG蛋白質共役型レセプターヒト SREB1 遺伝子の 3 kb の mRNAは調べた全てのヒト脳領域で検出され、ヒト脳内で広範に発現していることがわかった(図3)。

ヒト SREB2 の probe には cDNA 断片(配列番号:3 の第 558 番目から第 888 番目)を用いた。上記同条件でNorthern 解析を行ったところ、図4に示すように3.2 kb の mRNA が脳で、2.4 kb、3.5 kb、6.3 kb の mRNA が精巣で検出された。また、3.5 kb のシグナルが胎盤、脾臓で、3.2 kb のシグナルが小腸で若干検出された。本発明のG蛋白質共役型レセプターヒト SREB2 遺伝子の3.2 kb の mRNA は脳の中でも扁桃体、尾状核、海馬、黒質、視床下核、視床、小脳、大脳皮質群、被殻で多く検出され、脳梁、延髄、脊髄ではあまり検出されなかった。また、脳各領域で7.8 kb のシグナルが若干検出された(図5)。

ヒト SREB3 の probe には cDNA 断片(配列番号:5 の第 1 番目から第 652 番目)を用いた。上記同条件で Northern 解析を行ったところ、図6に示すように 4 kb、5.1 kb の mRNA が脳で、4 kb、5.1 kb、9.7 kb の mRNA が卵巣で検出された。本発明のG蛋白質共役型レセプターヒト SREB3 遺伝子の mRNA は脳の各領域で 4 kb をメインに 5.1 kb、若干 9.7 kb のシグナルとして検出され、4 kb の mRNA は扁桃体、海馬、視床下核、小脳、大脳皮質で、5.1 kb の mRNA は黒質、視床下核、脊髄で比較的多く検出された(図7)。

以上の結果より、本発明のG蛋白質共役型レセプターファミリー遺伝子 SREB1、SREB2 または SREB3 は中枢神経系、泌尿器生殖器系を中心に発現していることが示された。

(実施例3)ヒト新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質の発現の確認

ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 を発現させるための発現ベクターとして pCEP4 (Invitrogen 社)を用いた。そのとき、ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 の N 末端にマーカー配列として FLAG epitope を融合するために、SREB1、SREB2 または SREB3 の蛋白質コーディング配列の 5 末端に ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGGGATCCTG(配列番号: 13)を挿入した。このように構築したプラスミドはそれぞれ、pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 とした。これらのプラスミドを用いることで、ヒトSREB1、SREB2 または SREB3 のポリペプチドの N 末端に Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly lle Leu(配列番号14)が融合したポリペプチドが発現する。

10cm シャーレに 293-EBNA(Invitrogen 社)を 1x10[®]細胞で播種して1日培養後、8 μg の pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 および pCEP4-FL(ベクターのみ)を FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、一日培養した細胞を回収、洗浄後、20 mM Tris.HCl(pH7.4)/150 mM NaCl/コンプリート ™ (Boeringer Mannheim 社)に懸濁してポリトロンにてホモジェナイズした。ホモジェネートに最終濃度 0.2%、0.1%、0.2%になるように Triton X-100、Digitonin、sodium cholate を加え、4 ℃で2時間インキュベーションし、可溶化した。可溶化サンプルから M2-agarose(Sigma社)を用いて FLAG epitope 融合蛋白を免疫沈降した。免疫沈降物を 200 μM FLAG peptide/20 mM Tris-HCl(pH7.4)/150 mM NaCl で溶出した。溶出サンプルは濃縮後、SDS/10%~20% アクリルアミドゲル(第一化学薬品社)を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜に、ブロッキング後、マウス抗FLAG モノクローナル抗体(M2; Sigma社)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス lgG ポリクローナル抗体(Zymed社)を順次反応させた。反応後、ECL ウエスタンブロッティング検出システム(アマシャムファルマシア社製)を用いて SREB1、SREB2 またはSREB3 蛋白質の発現を確認した(図8)。

抗 FLAG 抗体と反応する蛋白質は pCEP4-FL を導入した細胞には存在しないが、pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 を導入した細胞では、35-45 kDa のパンドとして検出された。ヒト SREB1、ヒト SREB2、またはヒト SREB3 の推定分子量はそれぞれ、39.8 kDa、42.0 kDa、41.5 kDa であり、ほぼ予測される分子量にパンドが存在した。また、ヒト SREB1 では二量体と考えられる 65-75 kDa のパンドも検出された。

(実施例4)ラット SREB1(rSREB1)、ラット SREB2(rSREB2)、またはラット SREB3(rSREB3)蛋白質をコードする遺伝子の単離

rSREB1、rSREB2、又は rSREB3 をコードする全長 cDNA は、ラット脳由来の poly A+RNA(Clontech 社)を template として RT-PCR により取得した。

rSREB1 の 増 幅 に は forward primer と し て 5'-AAAATCTAGACGCGATGGCGAACGCTAGTGA-3'(配列番号: 15)、reverse primerとして 5'-AAAATCTAGA CACTTTGAGAGTCTTGTGAAGGC-3'(配列番号: 16)を用いた(それぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。cDNA の増幅、クローニング、塩基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号: 21に示す。

同配列は 1131 base の open reading frame (配列番号: 21の第1番目から第1131番目) を持っている。 open reading frame から予測されるアミノ酸配列(377 アミノ酸)を配列表配列番号: 22に示す。予想アミノ酸配列はヒト SREB1 と 97%一致していることから、本遺伝子が rSREB1 をコードすることが解った。

rSREB2 の 増 幅 に は forward primer と し て 5'-AAAATCTAGATCTATGGCGAACTATAGCCATGC-3'(配列番号: 17)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA AAGGCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3'(配列番号: 18)を用いた(それぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。cDNA の増幅、クローニング、塩

基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表配列番号:23に示す。

同配列は 1110 base の open reading frame (配列番号: 23の第1番目から第1110番目)を持っている。 open reading frame から予測されるアミノ酸配列(370 アミノ酸)を配列表配列番号: 24に示す。予想アミノ酸配列はヒト SREB2 と 100% 一致していることから、本遺伝子が rSREB2 をコードすることが解った。

rSREB3 の 増 幅 に は forward primer と し て 5'-AAAATCTAGACAAATACTGAACTGGCCGATCCCC-3'(配列番号: 19)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA TGTTGGCCCCAGTATGGTGATCAT-3'(配列番号: 20)を用いた(それぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。cDNA の増幅、クローニング、塩基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号: 25に示す。

同配列は1119 base の open reading frame (配列番号:25の第1番目から第1119番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(373 アミノ酸)を配列表配列番号:26に示す。予想アミノ酸配列はヒト SREB3 と 99%一致していることから、本遺伝子が rSREB3 をコードすることが解った。

実施例 5 ヒト SREB1 に対する抗体の作製

ヒト SREB1 に対する抗体を作製するための免疫用抗原としてヒト SREB1 の部分アミノ酸配列をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と融合したものを用いた。実際には、ヒト SREB1 のアミノ酸配列(配列番号2)の208番目から282番目の領域(3LO)および351番目から375番目の領域(C24)に相当する cDNA フラグメントに制限酵素 BamHI および Xhol 切断部位を結合した形でPCR 法にて増幅し、GST Gene Fusion Vector(pGEX-5X-1:アマシャムファルマシア社製)の BamHI、Xhol の間に挿入した。このように構築したプラスミドで、大腸菌 BL21(DE3) pLysS(Novagen 社製)のコンピテントセルを形質転換した。その

形質転換株を培養し、1mM IPTG にて発現誘導することで、GST-3LO 融合蛋白および GST-C24 融合蛋白を大腸菌内に発現させた。GST-3LO および GST-C24 は大腸菌破砕物から Glutathione Sepharose4B(アマシャムファルマシア社製)を用いて使用説明書に準じて精製した。

精製した GST-3LO 融合蛋白と Freund's complete adjuvant (CalBioChem 社)を等量混合しエマルジョン化したものを白色レグホン雌(140日齢)のフォアブリキュウス嚢付近に投与した。投与量は初回が 1mg でその後2週間おきに 0.5mg ずつ4回投与した。最終免疫後、採卵し、卵黄を生理食塩水で希釈後、デキストラン硫酸を用いて脱脂した後、DEAE Sepharose(アマシャムファルマシア社製)を用いて、IgYを精製し抗 3LO 抗体とした。また、精製した GST-C24 融合蛋白は TiterMax Gold(CytRX 社)と等量混合しエマルジョン化したものを日本白色ウサギ(6週齢)の背部皮下に投与した。投与量は初回が 1mg でその後2週間おきに 0.5mg ずつ2回投与した。最終免疫後、採血し、血清から、ProteinG Sepharose(アマシャムファルマシア社製)を用いて使用説明書に準じて、IgG を精製し抗C24 抗体とした。

抗 3LO 抗体はヒト SREB1 のアミノ酸配列(配列番号2)の208番目から282番目の領域を抗原としていること、この部分アミノ酸配列は SREB1、SREB2または SREB3で共通する配列を多く含むこと(図1参照)から、抗 3LO 抗体は SREB1、SREB2または SREB3を共通に認識する可能性が考えられる。また、抗 C24 抗体はヒト SREB1 のアミノ酸配列(配列番号2)の351番目から375番目の領域を抗原としていること、この部分アミノ酸配列は SREB2、3 には存在せず SREB1 にのみ存在する配列であること(図1参照)から、抗 C24 抗体は SREB1 のみを認識する可能性が考えられる。そこで、抗 3LO 抗体および抗 C24 抗体の特異性を確認するために、実施例3で調製した SREB1、SREB2 または SREB3 を発現させた 293-EBNA の抗 FLAG 抗体の免疫沈降物と抗 3LO 抗体および抗 C24 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

実際には、SDS/10%~20% アクリルアミドゲル(第一化学薬品社)を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。 転写後の PVDF 膜に、ブロッキング後、

10 μ g/ml の抗 3LO 抗体、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗ニワトリ μ g ポリクローナル抗体 (Zymed 社)を順次反応させるか、または、10 μ g/ml の抗 C24 抗体、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ μ g ポリクローナル抗体 (MBL 社)を順次反応させるかした。反応後、ECL ウエスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製)を用いて発色させた。抗 3LO 抗体と反応するバンドは実施例3の抗 FLAG 抗体と同等の位置に μ CEP4-FL-SREB1、 μ CEP4-FL-SREB2、または μ CEP4-FL-SREB3を導入した細胞で検出された (図9)。また、抗 C24 抗体と反応するパンドは実施例3の抗 FLAG 抗体と同等の位置に μ CEP4-FL-SREB1を導入した細胞にのみ検出された (図10)。

以上の結果より、抗3LO抗体はSREB1、SREB2またはSREB3を認識する抗体であり、 抗C24 抗体はSREB1 のみを認識する抗体であることが示された。これらの抗体を用いる ことで、ウエスタンブロット法や免疫組織染色法等で天然の SREB1、SREB2 または SREB3を検出することが可能となった。

実施例6 ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 導入細胞における cAMP-respons element(CRE)、serum response element(SRE)を介した転写活性の検討

CRE あるいは SRE を介した転写活性の上昇は、様々な G 蛋白質共役型レセプターの 細胞内情報伝達系の活性化に伴って引き起こされる(Lolait, S.J., et al. (1992) Nature, 357, 336-339; Hoeltzel, W.L., et al. (1997) Am. J. Physiol., 273, C2037-C2045; An, S., et al. (1998) J. Biol. Chem., 273, 7906-7910)。また、G 蛋白質共役型レセプターはアゴニスト非存在下でも一部の遷移的な活性型コンフォメーションを介して細胞内情報伝達系が部分的に活性化されることが知られている(Kenakin, T. (1995) Trens Pharmacol. Sci., 16, 188-192)。これらのことより、アゴニスト非存在下でも、SREB1、SREB2 または SREB3 導入細胞での CRE および SRE を介した転写活性の変化が見いだされれば、該 G 蛋白質共役型レセプターが機能的であること、また、該 G 蛋白質共役型レセプターの細胞内情報伝達系の活性化が CRE および SRE を介した転写活性とつながることを証明できる。

ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 を発現させるための発現ベクターとして pEF-BOS

(Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)を用い、pEF-BOS-SREB1、pEF-BOS-SREB2、pEF-BOS-SREB3 を作製した。24 ウェルプレートに 293-EBNA(Invitrogen 社)を 8x10 細胞で播種して1日培養後、250 ng の pEF-BOS-SREB1、pEF-BOS-SREB2、pEF-BOS-SREB3 および pEF-BOS(ベクターのみ)を 25 ng の CRE-reporter plasmid pCRE-Luc(Stratagene 社)あるいは SRE-reporter plasmid pSRE-Luc (Stratagene 社)と共に FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いて遺伝子導入した(各 3 ウェル)。遺伝子導入後、12 時間ごとに PicaGene Cell Culture Lysis Reagent Luc(ニッポンジーン社)を用いて細胞を溶解し、PicaGene Luminescence Kit(ニッポンジーン社)を用いて各 reporter plasmid から産生されるルシフェラーゼ活性を測定した。

遺伝子導入後 24 時間における SREB1、SREB2 または SREB3 を導入した細胞のルシフェラーゼ活性を、ベクターのみを導入した細胞(コントロール)のルシフェラーゼ活性に対する相対活性(コントロールを 1 とする)として処理した結果を図11(pCRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性)、図12(pSRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性)に示す。CRE を介した転写活性は SREB1 導入細胞で最も上昇し、SREB2、SREB3 導入細胞でもコントロールに対して有意に上昇していた。一方、SRE を介した転写活性は SREB2 導入細胞で最も上昇し、SREB1、SREB3 導入細胞で最も上昇し、SREB1、SREB3 導入細胞でもコントロールに対して有意に上昇していた。

これらの結果により SREB1、SREB2 または SREB3 が機能的レセプターであり、該 G 蛋白質共役型レセプターの細胞内情報伝達系の活性化が CRE あるいは SREを介した転写活性の上昇につながることが示された。

産業上の利用可能性

本発明により、中枢神経系に発現している新規なG蛋白質共役型レセプターファミリー 蛋白質 SREB1、SREB2 または SREB3、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むべ クター、該ベクターを含む宿主細胞、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法が 提供された。 また、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と被験薬を接触させることにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングし、新たな医薬、特に、新たな中枢性疾患治療剤をスクリーニングすることを可能にした。

本発明の中枢神経系に発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を特異的に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬は、中枢神経系の機能性/器質性疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質は中枢神経系のみならず、泌尿器生殖器系で発現していることから、その活性を特異的に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬は泌尿器生殖器系に関わる疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプターの内例えば SREB1 蛋白質は中枢神経系、泌尿器生殖器系に加え、心臓、末梢白血球で発現していることから SREB1 蛋白質の活性を特異的に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬は中枢性疾患、泌尿器生殖器系に関わる疾患に加え循環器系疾患、免疫炎症系疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。

本発明新規G蛋白質共役型レセプターファミリーSREB1、SREB2 または SREB3 はヒトとラットでアミノ酸の保存率が極めて高い。この保存率は既存のG蛋白質共役型レセプターファミリーの中で最も高く、このことは新規G蛋白質共役型レセプターファミリーSREB1、SREB2、及び SREB3 の生体内での役割、特に中枢神経系での生理的役割の重要性を示していると考えられる。また、ヒトとラットでアミノ酸配列が 97%以上の保存率を示していることから、本新規G蛋白質共役型レセプターファミリーSREB1、SREB2 または SREB3 に作用する薬物の活性には種差が殆ど無いと考えられる。従って、本発明のG蛋白質共役型レセプターは、それ自体又は当該レセプターを用いたスクリーニングから得られた化合物又は蛋白質を医薬として開発する際、ヒトに対する薬理効果を試験するに先立って、予め、例えばラット等の動物実験を行うことができるという利点があり、動物実験データからデータからヒトの臨床データを予測することが容易である点で有用である。

本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体は、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の臓器での発現およびその変動を ELISA アッセイ、ラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロット法等によって検出することが可能であり、診断薬として有用である。また、該新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する抗体は該新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質が関与する疾患の治療薬として、さらに該レセプター蛋白質の分離精製の道具としても有用である。

請求の範囲

- 1. 配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質。
- 2. 配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型 レセプター蛋白質。
- 3. 請求の範囲1に記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を 有する遺伝子。
- 4. 請求の範囲3記載の遺伝子を含むベクター。
- 5. 請求の範囲4記載のベクターを含む宿主細胞。
- 6. 請求の範囲5記載の宿主細胞を用いる請求の範囲1または乃至2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法。
- 7. 請求の範囲1または2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と被験化合物とを接触させ、当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質作用薬をスクリーニングする方法。
- 8. 請求の範囲1または2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体またはその断片。

図1 SREB 1 MANASEPGGSGGEAAALG----LKLATLSLLLCVSLAGN 36
SREB 2 MANYSHAADNILQNLSP--LTAFLKLTSLGFIIGVSVVGN 38
SREB 3 MANTTGEPEEVSGALSPPSASAYVKLVLLGLIMCVSLAGN 40 SREB 1 V L F A L L I V R E R S L H R A P Y Y L L L D L C L A D G L R A L A C L P A V M 76
SREB 2 L L I S I L L V K D K T L H R A P Y Y F L L D L C C S D I L R S A I C F P F V F 78
SREB 3 A I L S L L V L K E R A L H K A P Y Y F L L D L C L A D G I R S A V C F P F V L 80 SREB 1 LAARRAAAAAAAAAGAPPGALGCK LLAFLAALFCFHAAFLLLGV 116
SREB 2 NSVKNGSTWTY---GTLTCKVIAFLGVLSCFHTAFMLFCI 115
SREB 3 ASVRHGSSWTF---SALSCKIVAFMAVLFCFHAAFMLFCI 117 SREB 1 G VTRYLAIAHHRFYAERLAG W PCAAMLVCAAWALALAAAF 156 SREB 2 S VTRYLAIAHHRFYTKRLTFWTCLAV - ICMVWTLSVAMAF 154 SREB 3 S VTRYMAIAHHRFYAKRMTLWTCAAV - ICMAWTLSVAMAF 156 SREB 1 PPVLDGGG---DDEDAPCALEORPDGAPGALGFLLLLAVV 193
SREB 2 PPVLDVGTYSFIREEDQCTFCHRSFRANDSLGFMLLLALI 194
SREB 3 PPVFDVGTYKFIREEDQCIFEHRYFKANDTLGFMLMLAVL 196 SREB 1 V G ATHLVYL R LLFF I HDRRKM R PARL V PAV S H D W T F H G P G 233
SREB 2 LLAT OLVYLKL I F F V H D R K M K P V Q F V A A V S Q N W T F H G P G 234
SREB 3 M A A TH A V Y G K L L L F E Y R H R K M K P V Q M V P A I S Q N W T F H G P G 236 SREB 1 ATGQAAANW TAGFGRGPTPPALVGIRPAGPGRGARRLLVL 273
SREB 2 ASGQAAANW LAGFGRGPTPPTLLGIRQNANTTGRRRLLVL 274
SREB 3 ATGQAAANW IAGFGRGPMPPTLLGIRQNGHAASRR-LLGM 275 SREB 1 E E F K T E K R L C K M F Y A V T L L F L L W G P Y V V A S Y L R V L V R P G 313
SREB 2 D E F K M E K R I S R M F Y I M T F L F L T L W G P Y L V A C Y W R V F A R G P 314
SREB 3 D E V K G E K Q L G R M F Y A I T L L F L L L W S P Y I V A C Y W R V F V K A C 315 SREB 1 AVPQAYLTASVWLTFAQAGINPVVCFLFNRELRDCFRAQF 353
SREB 2 VVPGGFLTAAVWMSFAQAGINPFVCIFSNRELRCFSTTL 354
SREB 3 AVPHRYLATAVWMSFAQAAVNPIVCFLLNKDLKKCLRTHA 355 SREB 1 P C C Q S P R T T Q A T H P - - C D L K G I G L .
SREB 2 L Y C R K S - - - R L P R E P Y C - - - - V I .
SREB 3 P - C W G T G G A P A P R E P Y C - - - - V M . 376 371 374

図2

1.4

心臓 脳

胎盤

肺

肝臓

骨格筋

腎臓

膵臓

7.5-7.5-1.4-

PCT/JP99/01191

WO 99/46378

3/10

図3

扁桃体 尾状核 脳梁 海馬 全脳 黒質 視床下核 視床

小脳 大脳皮質 延髄 脊髄 大脳皮質後頭葉 大脳皮質前頭葉 大脳皮質側頭葉 被殼

図4

4.4-

9.5₋

心臓

脳

胎盤

肺

肝臓

骨格筋

腎臓

膵臓

7.51 7.41 1.41

脾臓

胸腺

前立腺

精巣

卵巢

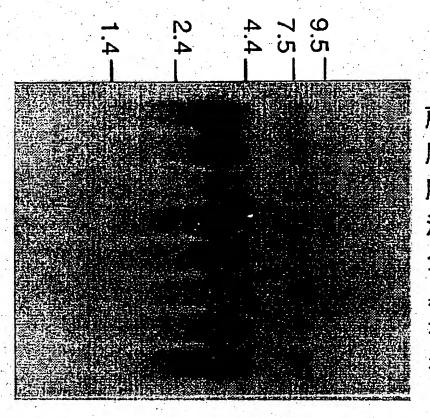
小腸

大腸

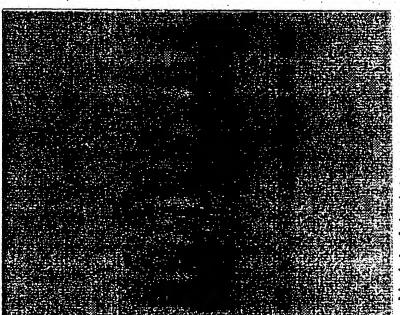
末梢血白血球

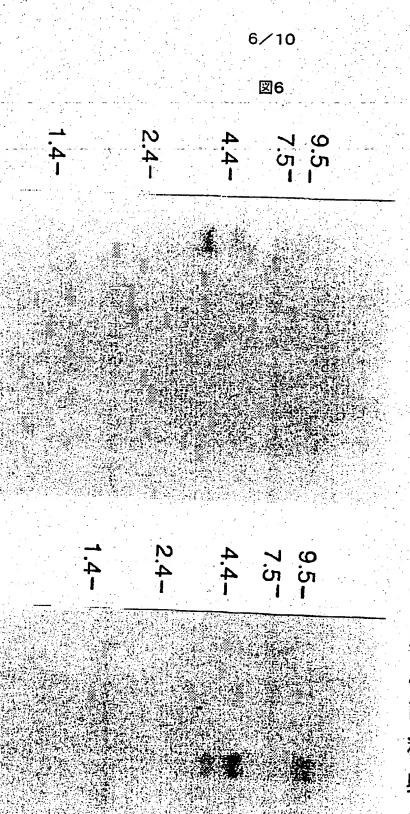
図5

9.5 7.5



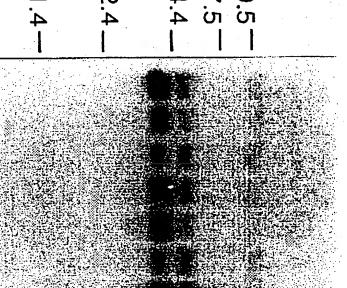
扁尾脳海全黒視視体核 梁馬脳質床床



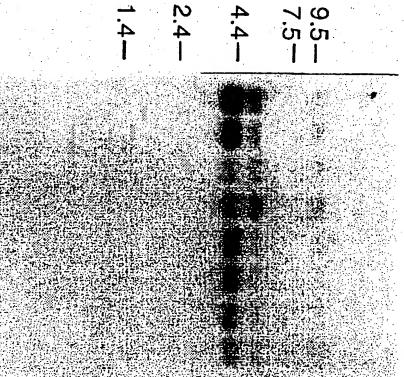


心脳胎肺肝骨腎膵臓盤臓筋臓臓

図7



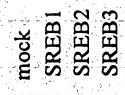
扁尾脳海全黒視視体核。 核

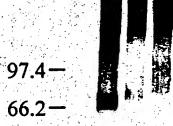


小脳皮質 水脳皮質 が大 が脱皮質 が脱皮質前頭葉 が設 が設 が設 WO 99/46378 PCT/JP99/01191

8/10

図8





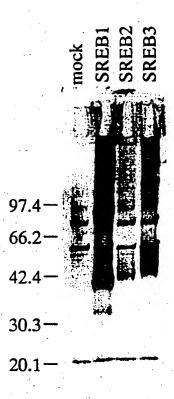
30.3

20.1 —

anti-FLAG

図9

図10



97.4—
66.2—
42.4—
30.3—

anti-3LO

anti-C24

WO 99/46378 PCT/JP99/01191

図11

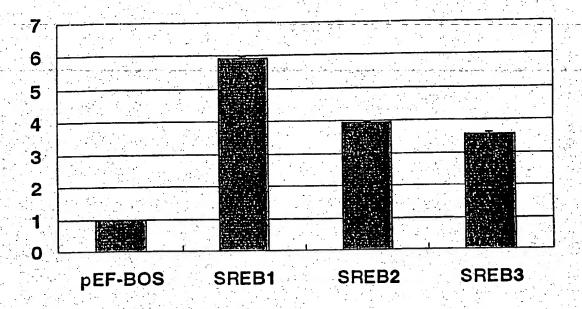
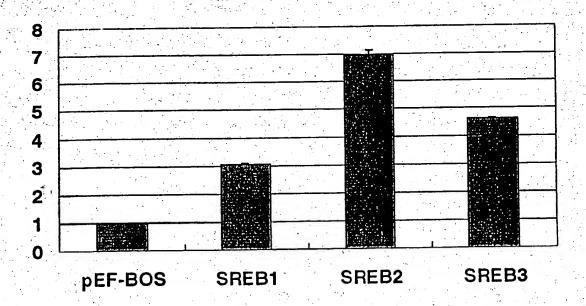


図12



SEQUENCE LIST

				. ;		31	EUUEI	VUE I	7121				,
<110)> Yamar	nouchi P	harmaceu	ıtica	I Co.	., i	td.	:.,					
<120)> A лоv	el G pr	otein co	uple	i red	cepto	or p	rotei	in Ţ	÷.			•
<130	> Y9905	-PCT										0	
	> JP P1 > 1998-	998-060 03-12	245	• *	: •	· · · · · · ·	• *	• •	:			. Vi	*
	> JP P1 > 1999-	999-026 02-03	774	* .	····	*.			•			\$ i.	
<160	> 26	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·					· .						
<170)	> Paten	tin Ver	2.0				•	*		=	•		
(212)	> 1128 > DNA	sapiens					•		*		*		
<220) <221)				*	•					i ji			· · ,
<223>	> SREB1		.).							- :			: .
<400) atg g Met A	gcg aac	gcg ago Ala Ser	gag cc Glu Pr	g ggt o Gly	ggc Gly	agc Ser 10	ggc Gly	ggc Gly	ggc Gly	gag Glu	gcg Ala 15	gcc Ala	48
gcc c Ala L	ctg ggc Leu Gly	ctc aag Leu Lys 20	ctg gc Leu Al	c acg a Thr	ctc Leu 25	Ser	ctg Leu	ctg Leu	ctg Leu	tgc Cys 30	Val	agc Ser	96
cta g Leu A	scg ggc la Gly 35	aac gtg Asn Val	ctg tto Leu Pho	gcg Ala 40	ctg Leu	c t g Leu	atc lle	gtg Val	cgg Arg 45	gag Glu	cgc Arg	agc Ser	144
Leu H	ac cgc lis Arg 50	gcc ccg Ala Pro	tac tac Tyr Tyr 5!	Leu	ctg Leu	c t c Leu	gac Asp	ctg Leu 60	tgc Cys	c tg Leu	gcc Ala	gac Asp	192
ggg c Gly L 65	tg cgc eu Arg	gcg ctc Ala Leu	gcc tgc Ala Cys 70	ctc Leu	ccg Pro	gcc Ala	gtc Val 75	atg Met	ctg Leu	gcg Ala	gcg Ala	cgg Arg 80	240
cgt g Arg A	cg gcg la Ala	gcc gcg Ala Ala 85	gcg ggg Ala Giy	gcg Ala	ccg Pro	ccg Pro 90	ggc Gly	gcg Ala	ctg Leu	ggc Gly	tgc Cys 95	aag Lys	288
ctg c Leu L	tc gcc eu Ala	ttc ctg Phe Leu 100	gcc gcg Ala Ala	ctc	ttc Phe 105	tgc Cys	ttc Phe	cac His	gcc Ala	gcc Ala 110	ttc Phe	ctg Leu	336

											A	• 1	,			
c t Le	g ctg u Lei	ıGly	Val	ggc	gtc Val	acc	Arg	Tyr	c t g Leu	gcc	atc	Ala	His	_cac His	cgc Arg	384
tt	c tai	115 gca	-	cgc	ctg	gcc	120 ggc		ccg	tgc	gcc	125		cte	ete	432
Ph	e Tyr	Ala	Glu	Arg	Leu	Ala	Gly	Trp	Pro	Cys	Ala 140	Ala	Met	Leu	Val	
tg Cy:	c gcc s Ala 5	gcc	tg g Trp	gcg Ala	ctg Leu 150	Ala	ctg Leu	gcc Ala	gcg Ala	gcc Ala 155	Phe	ccg Pro	cca Pro	gtg Val	ctg Leu 160	480
ga	c ggo o Gly	ggt Gly	ggc Gly	gac Asp 165	gac Asp	gag Glu	gac Asp	gcg Ala	ccg Pro 170	tgc Cys	gcc Ala	ctg Leu	gag Glu	cag Gin 175	Arg	528
cce Pro	e gac o Asp	ggc Gly	gcc Ala 180	ccc Pro	ggc Gly	gcg Ala	ctg Leu	ggc Gly 185	t t c Phe	ctg Leu	c t g Leu	ctg Leu	ctg Leu 190	gcc Ala	gtg Val	576
gtg Val	g gtg Val	ggc Gly 195	Ala	acg Thr	cac His	ctc Leu	gtc Val 200	tac Tyr	ctc Leu	cgc Arg	ctg Leu	ctc Leu 205	ttc Phe	ttc Phe	atc	624
cac His	gac Asp 210	Arg	cgc Arg	aag Lys	atg Met	cgg Arg 215	ccc Pro	gcg Ala	cgc Arg	ctg Leu	gtg Val 220	ccc Pro	gcc Ala	gtc Val	agc Ser	672
cac His	gac Asp	tgg Trp	acc Thr	t t c Phe	cac His 230	ggc Gly	ccg Pro	ggc Gly	gcc Ala	acc Thr 235	ggc Gly	cag Gin	gcg Ala	gcc Ala	gcc Ala 240	720
aac Asn	tgg Trp	acg Thr	gcg Ala	ggc Gly 245	ttc Phe	ggc Gly	cgc Arg	ggg Gly	ccc Pro 250	Thr	ccg Pro	ccc Pro	gcg Ala	ctt Leu 255	gtg Val	768
ggc Gly	atc	cgg Arg	ccc Pro 260	gca Ala	ggg Gly	ccg Pro	ggc Gly	cgc Arg 265	ggc Gly	gcg Ala	cgc Arg	cgc Arg	ctc Leu 270	ctc Leu	gtg Val	816
c t g Leu	gaa Glu	gaa Glu 275	t t c Phe	aag Lys	acg Thr	gag Glu	aag Lys 280	agg Arg	ctg Leu	tgc Cys	aag Lys	atg Met 285	ttc Phe	tac Tyr	gcc Ala	864
gtc Val	acg Thr 290	ctg Leu	ctc Leu	t t c Phe	ctg Leu	ctc Leu 295	ctc Leu	tgg Trp	ggg Gly	ccc Pro	tac Tyr 300	gtc Val	gtg Val	gcc Ala	agc Ser	912
tac Tyr 305	ctg Leu	cgg Arg	gtc Val	Leu	gtg Val 310	cgg Arg	ccc Pro	ggc Gly	gcc Ala	gtc Val 315	ccc Pro	cag Gin	gcc Ala	tac Tyr	ctg Leu 320	960
acg Thr	gcc Ala	tcc Ser	gtg Val	tgg Trp	ctg Leu	acc Thr	ttc Phe	gcg Ala	cag Gln	gcc Ala	ggc Gly	atc lle	aac Asn	ccc Pro	gtc Val	1008

										•						
gtg Val	t go Cys	tto SPhe	c cto Lei 340	Phe	aac Asn	agg Arg	gag Glu	ctg Leu _345	Arg	gac Asp	tgc Cys	t t c Phe	agg Arg 350	Ala	cag Gin	1056
t t c Phe	Pro	tgo Cys 355	Cys	cag Gin	agc Ser	ccc Pro	cgg Arg 360	Thr	acc Thr	cag Gin	gcg Ala	acc Thr 365	His	ccc Pro	tgc Cys	1104
		Lys		att			- -		· •	*			*		4,	1128
				,										e'		
<21	0> 2 1> 3	75				. 70	. *		• •• 				•0	*		
	2> P 3> H	RT omo	sapi	ens	*										. 1	
	0> 2		-			*	. :		• •							
-			Ala	Ser	Glu	Pro	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Glu	Ala	Ala	
1				5		χ.		•	10					15		rán .
Ala	Leu	Gly	Leu 20		Leu	Ala	Thr	Leu 25	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys 30	Val	Ser	
Leu	Ala	Gly 35		Va I	Leu	Phe	Ala 40	Leu	Leu	lle	Val	Arg 45	Glu	Arg	Ser	
Leu	His 50		Ala	Pro	Tyr	Tyr 55	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu 60	Cys	Leu	Ala	Asp	
Gly 65	Leu	Arg	Ala	Leu	Ala 70	Cys	Leu	Pro ·	Ala	Va I 75	Met	Leu	Ala	Ala	Arg 80	
Arg	Ala	Ala	Ala	Ala 85	Ala	Gly	Ala	Pro	Pro 90	Gly	Ala	Leu	Gly	Cys 95	Lys	· .
Leu	Leu	Ala	Phe 100	Leu	Ala	Ala	Leu	Phe 105	Cys	Phe	His	Ala	Ala 110	Phe	Leu	
Leu	Leu	Gly 115	Val	Gly	Va I	Thr	Arg 120	Tyr	Leu	Ala	ile	Ala 125	His	His	Arg	
Phe	Tyr 130	Ala	Glu	Arg	Leu	Ala 135	Gly	Trp	Pro	Cys	Ala 140	Ala	Met	Leu	Val	X
Cys 145	Ala	Ala	Trp	Ala	Leu 150	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala 155	Phe	Pro ·	Pro	Val	Leu 160	
Asp	Gly	Gly	Gly	Asp 165	Asp	Glu	Asp	Ala	Pro 170	Cys	Ala	Leu	Glu	GIn 175	Arg	
Pro	Asp	Gly	Ala 180	Pro	Gly	Ala	Leu :	Gly 185	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu 190	Ala	Val	
	-		5			-										

Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe Phe lle 200 His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala Val Ser His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ala Ala 225 235 Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala Leu Val 245 Gly lle Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu Leu Val Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe Tyr Ala 280 Val Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val Ala Ser 290 Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gin Ala Tyr Leu Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gin Ala Gly ile Asn Pro Val 330 Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg Ala Gln 340 345 350 Phe Pro Cys Cys Gln Ser Pro Arg Thr Thr Gln Ala Thr His Pro Cys Asp Leu Lys Gly lie Gly Leu 370 <210> 3 **<211> 1113** <212> DNA <213> Homo sapiens **<220>** <221> CDS **<222> (1)...(1110)** <223> SREB2 **<400> 3** atg gcg aac tat agc cat gca gct gac aac att ttg caa aat ctc tcg Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lle Leu Gln Asn Leu Ser cct cta aca gcc ttt ctg aaa ctg act tcc ttg ggt ttc ata ata gga Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe lle lle Gly

g t c Val	ago Ser	gtg Val 35	Val	g g g G l y	aac Asn	cto Leu	ctg Leu 40	Пe	t c c Se r	att	t t g Leu	cta Leu 45	Val	aaa Lys	ga t Asp	144
aag Lys	acc Thr 50	Leu	cat His	aga Arg	gca Ala	cct Pro 55	Tyr	tac Tyr	t t c Phe	ctg Leu	ttg Leu 60	gat Asp	ctt Leu	tgc Cys	tgt Cys	192
tca Ser 65	Asp	atc lle	ctc Leu	aga Arg	tct Ser 70	Ala	att lle	tgt Cys	ttc Phe	cca Pro 75	Phe	gtg Val	t t c Phe	aac Asn	tct Ser 80	240
gtc Val	aaa Lys	aat Asn	ggc Gly	tct Ser 85	Thr	tgg Trp	act Thr	tat Tyr	ggg Gly 90	act Thr	ctg Leu	act Thr	tgc Cys	aaa Lys 95	gtg Val	288
att	gcc Ala	t t t Phe	ctg Leu 100	Gly	gtt Val	t t g Leu	tcc Ser	tgt Cys 105	ttc Phe	cac His	act Thr	gct Ala	ttc Phe 110	atg Met	ctc Leu	336
t tc Phe	tgc Cys	atc lle 115	agt Ser	gtc Val	acc Thr	aga Arg	tac Tyr 120	tta Leu	gct Ala	atc	gcc Ala	cat His 125	cac His	cgc Arg	ttc Phe	384
tat Tyr	aca Thr 130	aag Lys	agg Arg	ctg Leu	acc Thr	ttt Phe 135	tgg Trp	acg Thr	tgt Cys	ctg Leu	gct Ala 140	gtg Val	atc	tgt Cys	atg Met	432
gtg Vai 145	tgg Trp	act Thr	ctg Leu	tct Ser	gtg Val 150	gcc Ala	atg Met	gca Ala	ttt Phe	ccc Pro 155	ccg Pro	gtt Val	tta Leu	gac Asp	gtg Vai 160	480_
ggc Gly	act Thr	tac Tyr	tca Ser	ttc Phe 165	att	agg Arg	gag Glu	gaa Glu	gat Asp 170	caa Gin	tgc Cys	acc Thr	ttc Phe	caa Gln 175	cac His	528
										ttt Phe						576
ctc Leu	atc lle	ctc Leu 195	cta Leu	gcc Ala	aca Thr	cag GIn	ctt Leu 200	gtc Val	tac Tyr	ctc Leu	aag Lys	ctg Leu 205	ata He	ttt Phe	ttc Phe	624
Val	cac His 210	gat Asp	cga Arg	aga Arg	aaa Lys	atg Met 215	aag Lys	cca Pro	gtc Val	cag Gin	t t t Phe 220	gta Val	gcá Ala	gca Ala	gtc Val	672
agc Ser 225	cag Gln	aac Asn	tgg Trp	act Thr	ttt Phe 230	cat His	ggt Gly	cct Pro	gga Gly	gcc Ala 235	agt Ser	ggc Gly	cag GIn	gca Ala	gct Ala 240	720
gcc Ala	aat Asn	tgg Trp	cta Leu	gca Ala 245	gga Gly	ttt Phe	gga Gly	Arg	ggt Gly 250	ccc Pro	aca Thr	cca Pro	ccc Pro	acc Thr 255	ttg Leu	768

ctg ggc atc agg caa aat gca aac acc aca ggc aga aga agg cta ttg Leu Gly lie Arg Gin Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Arg Leu Leu 260 265 265 270 gtc tta gac gag ttc aaa atg gag aaa aga atc agc aga atg ttc tat Val Leu Asp Giu Phe Lys Met Giu Lys Arg lie Ser Arg Met Phe Tyr 275 280 285 285 286 ata atg act itt ctg ttt cta acc ttg tgg ggc ccc tac ctg gtg gcc lie Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala 290 295 300 tgt tat tgg aga gtt ttt gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga ttt Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 315 310 315 320 cta aca gct gct gtc tgg atg agt ttt gcc caa gca gga atc aat cct Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gin Ala Gly lie Asn Pro 325 330 335 ttt gtc tgc att ttc tca aac agg gag ctg agg cgc tgt ttc agc aca Phe Val Cys lie Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa ct tac tgt Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys 355 360 370 (210) 4 (211) 370 (212) PRT (213) Homo sapiens (400) 4 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lie Leu Gin Asn Leu Ser 1 5 10 113 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe lie lie Gly 370 281 Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser lie Leu Leu Val Lys Asp 365 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 60 Ser Asp lie Leu Arg Ser Ala lie Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65 70 75 80 Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val 85 90 Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val	ï							2						•						
ata atg act tit ctg tit cta act tig tig ggc ccc tac ctg gtg gcc lie Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala 280 295 300 tigt tat tigg aga gtt tit gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga tit gcc ys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 305 310 320 cta aca gct gct gtc tigg atg agt tit gcc caa gca gga atc aat cct Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly lie Asn Pro 330 330 tit gtc tigc att tic tca aac agg gag ctg agg cgc tigt tic agc aca Phe Val Cys lie Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 345 350 acc ctt ctt tac tigc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct tac tigt Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys 355 365 gtt ata tiga 370 (210) 4 (210) 4 (210) 4 (211) 370 (212) PRT (213) Homo sapiens (400) 4 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lie Leu Gin Asn Leu Ser 1 5 10 15 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe lie lie Gly 20 30 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser lie Leu Leu Val Lys Asp 35 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 60 Ser Asp lie Leu Arg Ser Ala lie Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 76 7 80 Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val		Le	lg eu	ggo	at / 11	e A	rg	caa Gln	aa Ası	t gc n Al	a aa a As	n, Th	r Th	a gg r Gi	c aga y Arg	a aga g Arg	Arg	Lei	a ttg u Leu	816
tgt tat tgg aga gtt ttt gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga ttt 960 tgt tat tgg aga gtt ttt gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga ttt 960 Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 305 310 cta aca gct gct gtc tgg atg agt ttt gcc caa gca gga atc aat cct 1008 Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly lie Asn Pro 325 330 ttt gtc tgc att ttc tca aac agg gag ctg agg cgc tgt ttc agc aca 1056 Phe Val Cys lie Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct tac tgt 1104 Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys 365 gtt ata tga Val lie 370 (210) 4 (211) 370 (212) PRT (213) Homo sapiens (400) 4 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lie Leu Gln Asn Leu Ser 1 5 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe lie lie Gly 30 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser lie Leu Leu Val Lys Asp 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 Ser Asp lie Leu Arg Ser Ala lie Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 75 80 Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val 1 Ser Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val		g t Va	11 1	Leu	l As	pG,	lu i	t t c Phe	aaa Lys	a at	t GI	u Lys	a ag s Ar	a at	c ago e Ser	Arg	atg Met	t to Phe	tat Tyr	864
Cys lyr lrp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 305 310 Cta aca gct gct gt tgg atg agt ttt gcc caa gca gga atc aat cct Leu Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly lle Asn Pro 325 325 330 335 tit gtc tgc att ttc tca aac agg gag ctg agg cgc tgt ttc agc aca 1056 Phe Val Cys lle Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct tac tgt 1104 Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys 355 gtt ata tga Val lle 370 (210> 4 (211> 370 (212> PRT (213> Homo sapiens (400> 4 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lle Leu Gln Asn Leu Ser 1 5 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe lle lle Gly 20 25 30 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu lle Ser lle Leu Leu Val Lys Asp 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 Ser Asp lle Leu Arg Ser Ala lle Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 75 80 Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val		at II	e n	ne t	1.0	t ti	it d ne L	tg eu	t t t Phe	Lei	u Th	c ttg r Lei	tgi I Tri	g gge p Gly	y Pro	Tyr	ctg Leu	gtg Val	gcc Ala	912
tit gic tgc att tic tca aac agg gag ctg agg cgc tgt tic agc aca 1056 Phe Val Cys lie Phe Ser Asn Arg Giu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct tac tgt 1104 Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Giu Pro Tyr Cys 355 gtt ata tga Val IIe 370 (210> 4 (211> 370 (212> PRT (213> Homo sapiens (400> 4 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn IIe Leu Gin Asn Leu Ser 1		_ Uy	2 1	at yr	tg; Tr;	g ag o Ar	a g g V	tt al	rne	Ala	a aga	a ggg g Gly	r cci Pro	o Val	Val	cca Pro	ggg Gly	gga Gly	Phe	960
acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct tac tgt 1104 Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys 355 360 365 gtt ata tga Val ile 370 (210) 4 (211) 370 (212) PRT (213) Homo sapiens (400) 4 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gin Asn Leu Ser 1 5 15 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe ile Ile Gly 20 25 30 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp 35 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60 Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65 70 75 80		ct Le	a a u T	ca hr	gc i	gc Al	a y	a I	tgg Trp	atg Met	ag Sei	t ttt Phe	Ala	Gln	gca Ala	gga Gly	He	Asn	cct Pro	1008
gtt ata tga Val ile 370 (210> 4 (211> 370 (212> PRT (213> Homo sapiens (400> 4 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gin Asn Leu Ser 1		t t Ph	t g	t c a l	t go Cys	11	e P	t c he	tca Ser	aac Asn	agg Arg	Glu	Leu	g agg Arg	cgc Arg	tgt Cys	Phe	agc Ser	aca Thr	1056
Val IIe 370 (210) 4 (211) 370 (212) PRT (213) Homo sapiens (400) 4 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn IIe Leu Gin Asn Leu Ser 1 5 10 15 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Giy Phe IIe IIe Giy 20 25 30 Val Ser Val Val Giy Asn Leu Leu IIe Ser IIe Leu Leu Val Lys Asp 35 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60 Ser Asp IIe Leu Arg Ser Ala IIe Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65 70 75 80	·.	Thi	C C	t t eu	Leu	IУ	c t r C	gc ys	aga Arg	aaa Lys	Ser	Arg	t t a Leu	cca Pro	agg Arg	Glu	cct Pro	tac Tyr	tgt	1104
(211) 370 (212) PRT (213) Homo sapiens (400) 4 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn He Leu Gin Asn Leu Ser 1 1 5 10 15 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe He He Gly 20 25 30 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu He Ser He Leu Leu Val Lys Asp 35 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 50 60 Ser Asp He Leu Arg Ser Ala He Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 70 75 80 Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val			ı	l e	tga												ŭ.	0		1113
Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn IIe Leu Gin Asn Leu Ser 1 5 10 15 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Giy Phe IIe IIe Giy 20 25 30 Val Ser Val Val Giy Asn Leu Leu IIe Ser IIe Leu Leu Val Lys Asp 35 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60 Ser Asp IIe Leu Arg Ser Ala IIe Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65 70 75 80 Val Lys Asn Giy Ser Thr Trp Thr Tyr Giy Thr Leu Thr Cys Lys Val		<21 <21	1>2>	37 PR	T -	sapi	ens					e e								
Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe lie lie Gly 20 25 30 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu lie Ser lie Leu Leu Val Lys Asp 35 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60 Ser Asp lie Leu Arg Ser Ala lie Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65 70 75 80 Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val					Asn	Tvr	Se	r 1	lie	Δia	Δla	A c o	Acn	l la	Lau	C1		*		
Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu lle Ser lle Leu Leu Val Lys Asp 35 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60 Ser Asp lle Leu Arg Ser Ala lle Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65 70 75 80 Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val		, A.				٠.		5		12.0			10				X.	15		
Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65 70 75 80 Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val		Pro	Le	u i	Thr	A I a 20	Ph	e L	eu	Lys	Leu		Ser	Leu	Gly	Phe		l l e	Gly	
Ser Asp He Leu Arg Ser Ala He Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65 70 75 80 Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val		Val	Se	r \	7a I 35	Val	GI	уΑ	sn	Leu	Leu 40	lle	Ser	lle	Leu		/al.l	Lys	Asp	
Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val	5	Lys	Th 5	r L O	_eu	His	År	g A	lai	Pro 55	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Leu /	Asp L	.eu (Cys	Cys	0
		Ser 65	As	p i	le	Leu	Ar	g S	er / 70	Ala	lle	Cys	Phe		Phe 1	Val P	he /	Asn		, i
		Va I	Ly	s A	sn	Gly	Se 8	r T 5	hr 1	Trp	Thr	Tyr		Thr	Leu	Thr C	ys L		Val	سفده على وتطلق علي

He	e Ala	Phe	Leu 100		/ Val	Leu	Ser	Cys		His	Thr	· Ala	Phe 110		Lei
Phe	Cys	ile 115		Val	Thr	Arg	Tyr 120		Ala	lle	Ala	His 125		Arg	Pho
Tyr	Thr 130		Arg	Leu	Thr	Phe 135		Thr	Cys	Leu	140		He	Cys	Met
Val 145	Trp	Thr	Leu	Ser	Val 150		Met	Ala	Phe	Pro 155		Val	Leu	Asp	Va I 160
Gly	Thr	Tyr	Ser	Phe 165	lle	Arg	Glu	Glu	Asp 170		Cys	Thr	Phe	GIn 175	
Arg	Ser	Phe	Arg 180		Asn	Asp	Ser	Leu 185		Phe	Met	Leu	Leu 190	Leu	Ala
Leu	ile	Leu 195		Ala	Thr	Gin	Leu 200	Val	Tyr	Leu	Lys	Leu 205	lle	Phe	Phe
Val	His 210	Asp	Arg	Arg	Lys	Met 215	Lys	Pro	Val	Gin	Phe 220		Ala	Ala	Val
Ser 225	GIn	Asn	Trp	Thr	Phe 230	His	Gly	Pro	Gly	Ala 235	Ser	Gly	GIn	Ala	Ala 240
Ala	Asn	Trp	Leu	A1a 245	Gly	Phe	Gly	Arg	Gly 250	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr 255	Leu
Leu	Gly	He	Arg 260	Gin	Asn	Ala	Asn	Thr 265	Thr	Gly	Arg	Arg	Arg 270	Leu	Leu
Va I	Leu	Asp 275	Glu	Phe	Lys	Met	Glu 280	Lys	Arg	He	Ser	Arg 285	Met	Phe	Tyr
He	Me t 290	Thr	Phe	Leu	Phe	Leu 295	Thr	Leu	Trp	Gly	Pro 300	Tyr	Leu	Val	Ala
Cys 305	Tyr	Trp	Arg	Val	Phe 310	Ala	Arg	Gly	Pro	Val 315	Val	Pro	Gly	Gly,	Phe 320
Leu	Thr	Ala	Ala	Val 325	Trp	Met	Ser	Phe	Ala 330	GIn	Alá	Gly	lle · .	Asn 335	Pro
Phe	Val	Cys	11e 340	Phe	Ser	Asn	Arg	G1u 345	Leu	Arg	Arg	Cys	Phe 350	Ser	Thr
Thr	Leu	Leu 355	Tyr	Cys	Arg	Lys	Ser 360	Arg	Leu	Pro	Arg	G1u 365	Pro	Tyr	Cys
Val	11e 370		•	8			•			*	٠.				. •

	10>			*			· .	-		, . , ,			*	× ~'.		
		1122		er.		, · · · ·					÷	-		*	1	
	12> 1						*.					1 d 4				-
ζ2	132 1	Howo	sap	iens									8			
/0	001					. •••							٠.	1		
	20>											•*		, ,		·:-
	21> (/		ا معر ومد ره			بنست				ر در موف مساحد	ا دو پشي	— ,	ارد این از است	إساليات
		(1) SREB3		(9)								, ·	1			
(2)	23/ 3	OKEDS	•			*:	: 			**						
741	00> :	41.			*		·		F				. e-c . e-c		e de de es	
-	-												,	2		
a Li	F FC	. Aac	act The	acc TL-	gga	gag	CCI	gag	gag	gtg	agc	ggc	gct	ctg	tcc	48
me	1	a Maii	1 1111	. ur	Gįy	GIU	Pro	Glu			Ser	Gly	Ala	Leu	Ser	
	١.			. 5			,		10			•	51	15		0
				. (3	0					
D	a ccs	3 100	gca	tca	gcı	tat	gtg	aag	ctg	gta	ctg	ctg	gga	ctg	att	96
FIL	JPIL	3 261	20	ser	Ala	ıyr	val			Vai	Leu	Leu	<i>7</i>	Leu	He	
			20					25		Xx a			30			
				المراجع المراجع					*		4 4			0.		
a i E	e Cua	grg	agc	ctg	gcg	ggt	aac	gcc	atc	ttg	tcc	ctg	ctg	gtg	ctc	. 144
me i	LLYS	35	ser	Leu	Ala	ыу		Ala	He	Leu	Ser		Leu	Val	Leu	
*	÷ .	. 33					40			r		45				
220				44.4		,										
aag	S E A E	CEL	gcc	ctg	cac	aag	gct	CCT	tac	tac	ttc	ctg	ctg	gac	ctg	192
Lys	. GTU 50	AIR	AIZ	Leu	HI2			Pro	ıyr	lyr		Leu	Leu	Asp	Leu	
	50		· .			55				-	- 60	٠.				
+ ~ ~			-		a.b.a	χ.										,s _ 1
. Igu	Cig	gcc.	gat	ggc	ata	cgc	tct	gcc	gtc	tgc	ttc	CCC	ttt	gtg	ctg	240
Cys	Leu	AIZ	ASP	Gly		Arg	Ser	Ala	Val		Phe	Pro	Phe	Val		
65	,				70		Θ,			75					80	
~~+		-4-														
gct	101	gig	ege	cac	ggc	TCT	tca	tgg	acc	ttc	agt	gca	ctc	agc	tgc	288
MIA	Ser	Vai	Arg	His	GIY	ser,	Ser	Irp		Phe	Ser	Ala	Leu		Cys	
				. 85					90				r.	95		
							1		1		-				*	
lve	all	RIB	gcc	III	gra	gcc	gtg	CIC	ָזזז	tgc	ttc	cat	gcg	gcc	ttc	336
Lys	116	Val	100	Phe	met	AIA	val	Leu	Phe	Cys	Phe	His		Ala	Phe	* .
		* .	100					105	9				110			
			4					٠.						: :		
list	Lig	ונט	rgc	atc	agc	gtc	acc	cgc	tac	atg	gcc	atc	gcc	cac	cac	384
mc t	ren	115	cys	lle	ser	vai	INT	Arg	ıyr	Met	Ala		Ala	His.	His	
		113					120				· .	125				
686	***	+														
Ara	Dha	Tur	RCC	aag	cgc	arg	aca	CIC	tgg,	aca	tgc	gcg	gct	gtc	atc	432
Arg	130	1 7 1	міа	LYS.	Arg	met	Inr	Leu	Irp	inr		Ala	Ala	Val	He.	
	130					135				* .	140			T.		
toe	2+~		+~~			A - 4						8				
. IRC	arg	RCC	IRR	acc	CTE	101	gig	gcc	atg	gcc	TTC	cca	cct	gtc	ttt	480
14E	Met	Ala	irp	Thr	ren	Ser	Val	Ala	Met		Phe	Pro	Pro	Val		. •
145					150					155					160	٠.
	- A -												*			
gac	gtg	ggc	acc	tac	aag	ttt	att	cgg	gag	gag	gac	cag	tgc	atc	ttt	528
ASD	vai	GIY	ınr	Tyr	Lys	Phe	He	Arg	Glu	Glu	Asp	Gin	Cys		Phe	• . •
	* . *		+	165				. :	170			•		175	• • •	
			.													
Rag	cat	cgc	tac	TTC	aag	gcc	aat	gac	acg	ctg	ggc	ttc	atg	ctt,	atg	576
							٠,									

<210> 6
<211> 373
<212> PRT
<213> Homo sapiens

	370		,													
Pro	Tyr													*		1166
ccc	tac	tgt	gťc	atö	t ga		•							*		1122
1111	1115	355	r10	Cys	ITP	uly	360	uly	μly	AIA	rro	A1a 365	rro	Arg	GIU	, *
act	cac	gcc	CCC	tgc	tgg	ggc	aca	gga	gg t	gcc	ccg	gct	ccc	aga	gaa	1104
;	•	٠.	340				×	345					350			•
cca Pro	att lle	gtc Val	tgc Cys	t t c Phe	ctg Leu	ctc Leu	aac Asn	aag Lys	gac Asp	ctc Leu	aag Lys	aag Lys	tgc Cys	ctg Leu	agg Arg	1056
				325	:				330			*		335		
Tyr	Leu	Ala	Thr	Ala	Val	Trp	Met	Ser	Phe	Ala	Gin	Ala	Ala	Val	Asn	1000
tac	cto	gen	act	ert	gtt	too	ato	200	tte	gr^	Lsa.	ort		gtc	220	1008
305	Cys	ıyr.	ırp	Arg	7a I 310	rne	Val	Lys	Ala	Cys 315	Ala	Val∙	Pro	His	Arg 320	•
														cac		960
	290			٠	1	295				•	300		6			
	Ala													atc lle		912
•					_ * -						- 4-					
Leu	Gly	Me t 275	Asp	Glu	Val	Lys	Gly 280	Glu	Lys	Gln	Leu	Gly 285	Arg	Met	Phe	
ctg	ggc	atg	gac	gag	gtc	aag	ggt	gaa	aag	cag	ctg	ggc	cgc	atg	ttc	864
			260	,,,,		, WHII	VOII	265	1112	. nia	nj đ	JEI	270	AI B	FER	
acc Thr	ctg	ctg	ggt	atc	Cgg	cag	aat	GES ESS	cat	gca Ala	gcc Ala	agc	cgg	cgg Arg	cta	816
				245	00				250				•.	255		*
Ala	Ala	Ala	Asn	Trp	lle	Ala	Gly	Phe	Gly	Arg	Gly	Pro	Met	cca Pro	Pro	768
٠.	ac t	000	306													700
Ala 225	He	Ser	Gin	Asn	Trp 230	Thr	Phe	His	Gly	Pro 235	Gly	Ala	Thr	Gly	Gin 240	
gcc	atc	agc	cag	aac	tgg	aca	ttc	cat	ggt	ccc	888	gcc	acc	ggc	cag	720
	210			0		215		•	-, •		220		*			
														gtg Val		672
		195			. '		200	. :				205	•			* **
		Val	Leu				Thr	His				Gly		ctg Leu	Leu	624
***	901	~ • ~				4				_ i _		-				C0.4
Glu	His	Arg	Tyr 180		Lys	Ala	Asn	Asp 185		Leu	Gly	Phe	Me t	Leu	Met	
		٠.														

<40	0> 6					3			0.					-! '-"		
	•	Asn	Thr	Thr 5	Gly	Glu	Pro	Glu	Glu 10	Val	Ser	Gly	Ala	Leu 15	Ser	
Pro	Pro	Ser	Ala 20	Ser	Ala	Tyr	Val	Lys 25	Leu	Val	Leu	Leu	Gly 30	Leu	lle	
Met	Cys	Val	Ser	Leu	Ala	Gly	Asn 40	Ala	Tle	Leu	Ser	Leu 45	Leu	Val	Leu	
Lys	Glu 50	Arg	Ala	Leu	His	Lys 55	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Phe 60	Leu	Leu	Asp	Leu	
Cys 65	Leu	Ala	Asp	Gly	1 i e 70	Arg	Ser	Ala	Val	Cys 75	Phe	Pro	Phe	Val	Leu 80	
Ala	Ser	Val	Arg	His 85	Gly	Ser	Ser	Trp	Thr 90	Phe	Ser	Ala	Leu	Ser 95	Cys	
Lys	lle	Val	Ala 100	Phe	Met	Ala	Val	Leu 105	Phe	Cys	Phe	His	Ala 110	Ala	Phe	
Met	Leu	Phe 115	Cys	lle	Ser	Val	Thr 120	Arg	Tyr	Met	Ala	e 125	Ala	His	His	
Arg	Phe 130	Tyr	Ala	Lys	Arg	Met 135	Thr	Leu	Trp	Thr	Cys 140	Ala	Ala	Val	lle	
Cys 145	Met	Ala	Trp	Thr	Leu 150	Ser	Val	Ala	Met	Ala 155	Phe	Pro	Pro	Val	Phe 160	
Asp	Val	Gly	Thr	Tyr 165	Lys	Phe	lle	Arg	Glu 170	Glu	Asp	Gin	Cys	lle 175	Phe	
Glu	His	Arg	Tyr 180	Phe	Lys	Ala	Asn	Asp 185	Thr	Leu	Gly	Phe	Me t 190	Leu	Met	
Leu		Val 195	Leu	Met	Ala	Ala	Thr 200	His	Ala	Val	Tyr	Gly 205	Lys	Leu	Leu	
Leu	Phe 210	Glu	Tyr	Arg	His	Arg 215	Lýs	Met	Lys	Pro	Va I 220	Gin	Met	Val	Pro	
Ala 225	lle	Ser	GIn	Asn	Trp 230	Thr	Phe	His	Gly	Pro 235	Gly	Ala	Thr	Gly	GIn 240	
Ala	Ala	Ala	Asn	Trp 245	lle	Ala	Gly	Phe	Gly 250	Arg	Gly	Pro	Met	Pro 255	Pro	
Thr	Leu	Leu	Gly. 260	lle	Arg	GIn	Asn	Gly 265		Ala	Ala	Ser	Arg 270	Arg	Leu	
Leu	Gly	Me t 275	Asp	Glu	Val	Lys	Gly 280	Glu	Lys	GIn	Leu	Gly 285		Met	Phe	

							¥ •									
Tyr	Ala 290		Thr	Leu	Leu	Phe 295	Leu	Leu	Leu	Trp	Ser 300	Pro	Tyr	He	Val	
			4*													
Ala 305	Cys	Tyr	Trp	Arg			Val	Lys	Ala		Ala	Val	Pro	His		
303	٠.				310	-				315					320	
Tyr	Leu	Ala	Thr	Ala	Val	Trp	Met	Ser		Ala	Gln	Ala	Ala		Asn	
				325					330				: .	335		
Pro	He	Val	Cys	Phe	Leu	Leu	Asn	Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Cys	Leu	Arg	
	•		340		-			345					350		-,	-
Thr	His	Ala	Pro	Cys	Trp	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala	Pro	Arg	Glu	
**		355					360					365		,		
Pro	Tvr	Cvs	Val	Met		• • •	* *									
	370							. N. e								1 .
				· .			•				•	* ,		1	' .	
<210	7 (•			٠.
<21 1		I						Ι.,						. •		
<212						:				•						
<213	A, <i< td=""><td>rtifi</td><td>cial</td><td>Seq</td><td>uenc</td><td>e :</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></i<>	rtifi	cial	Seq	uenc	e :										
<220	is .								•			*				
-	•	escri	ptio	n of	Art	ific	ial	Segu	ence	·For	ward	l hri	mer.			
			,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	• .	****			ooqu			naiv		iii G i			
<400	•												•	-		• • •
aaaa	tcta	iga c	gcga	tggc	g aa	cgcg	agcg	а				٠.			Y	31
•	. •		* *		•					****	•					
	> 8		•				-					•				
<211					*,					•						•
<212						,	•									•.
(213	2 AI	1111	CIAI	Seq	uenc	е										
<220	>			-							•				. :	•
<223	> De	scri	ptio	n of	Art	ific	ial	Sequ	ence	: rev	erse	pri	mer			•
		,									• •			•		
-	> 8 tcta		teta	tgtg		aaar	ctcc.	•						•		31
		, g u _ g	, t y t a	IBIB	5 · 5	8886		٠.,					* *			31
					•				*	• '	•		,* 1			
(210								•		÷ -						
(211 (211	-											,	٠,			
	> DN		a i a I	Seq		_	٠.				•	•	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •			
(213	/ NI			seq	UEIIC	C				•				•		
(220	>															•
(223	> De	scri	ptio	n of	Art	ific	ial	Sequ	ence	:For	ward	pri	mer		*	
						٠.			•							
(400) aaaa		ga t	ctat	ggcga	a 2r	tata	arre	tar	2							2.4
4		ou l	vial	00.0	u at		BULA	ıgu	a	•				•		34
									•	*		٠,				

	11> 35 1 1 1 1 1 1 1 2 2 1 1 2 2 1 1 2 2 1 1 2 2 1 2 2 1 2 2 1 2 2 1 2 2 1 2 2 1 2	
	12> DNA 13> Artificial Sequence	
〈220〉	205	
	23> Description of Artificial Sequence:reverse primer	
_	0> 10	مخيب نده خورت ازاك في سيد الماسية والماسية
	atctaga aaggctaaag atttacagat gctcc	35
⟨210⟩		
<211>	1> 33 (U.S.) The hardware hardware from the highest field the	
	2> DNA 3> Artificial Sequence	
<220>	현상님 그 이 바이 그 그리고 아내는 그는 그리는 밤에 가셨다.	
	3> Description of Artificial Sequence:Forward primer	
	o> 11	
aaaato	atctaga gtatggccaa cactaccgga gag	33
<210>	∩ ` 12	
<211>	1> 31	
	2> DNA 3> Artificial Sequence	
<220>		
	3> Description of Artificial Sequence:reverse primer	
<400>		
aaaatc	atctaga cctgtctgcc taccagcctg c	31
<210>	D 13	
<211>	 36 (1) (2) (2) (3) (4) (4) (4) (4) (4) (4) (4) (4) (4) (4	
<212> <213>	B) Artificial Sequence	
<220>		
<223> 1	Description of Artificial Sequence:FLAG epitope	
<400>		
alggac	actaca aggacgacga tgacaagggg atcctg	36
<210> 1	> 14	
<211> 1<212> F	> 12	
	> Artificial Sequence	
〈220 〉		
	> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope	
* .		

1 5	ap hap Lya	10	. cu .*		
Z010\ 15	·	- *			,
(210) 15					
(211) 32		*		**	
<pre><212> DNA </pre>					
<pre><213> Artificial Sequence</pre>		8.00			
⟨220⟩	*•				
<pre><223> Description of Arti</pre>	ficial Coqu	anca:Earw	ard primar		•
(223) Description of Arti	iiciai sequ	ence.Furw	aru primer		
⟨400⟩ 15	•.		₩. *		
aaaatctaga cggcgatggc gaa	cectaet ea				32
					JŁ
18					
<210> 16			* * *		÷.,
⟨211⟩ 33					
<212> DNA				· · · · · · · ·	
(213) Artificial Sequence	•		**		
		·			
<220>				• •	
<223 Description of Artif	ficial Sequ	ence:reve	rse primer		
(100)				•	
⟨400⟩ 16		£1		• • .	
aaaatctaga cactttgaga gtc	itgigaa ggc		·	•	33
	٠.,				
⟨210⟩ 17					
⟨211⟩ 33	*				٠.
<212> DNA					
(213) Artificial Sequence					
⟨220⟩					
<223> Description of Artif	icial Sequ	ence:Forwa	ard primer		
			*		
<400> 17		1		V	
aaaatctaga tctatggcga acta	tagcca tgc	•	0.		33
			× .		
(0.0)					
⟨210⟩ 18 ⟨211⟩ 35				•	
(212) DNA					
(213) Artificial Sequence		*			
(213) Willingtal Seduence			*		
⟨220⟩		•		•	ŧ
<pre><223> Description of Artif</pre>	icial Segue	nce · Form	rd primer		
(120) DOGG (PC) OIL OI NI (II		UI W	u piillici		
⟨400⟩ 18			• •		•
aaaatctaga aaggctaaag attt	acagat ecto	c c			35
TITLE THE STATE OF				* .	
•••				. *	
⟨210⟩ 19					
<211> 34			•		_
<212> DNA	-	, :		•	•
<213> Artificial Sequence			4		

<220 <223		escr	ipti	on o	f Ar	tifi	cial	Seq	uenc	e:re	vers	e pr	imer			
<400 aaaa	-		caaa	tact	ga a	ctgg	ccga	t-cc	CC		· · · ·					3.4
<210 <211 <212 <213	> 3 > D	4 NA	icia	l Se	quen	ce										
<220 <223	-	escr	ipti	on o	f Ar	tifi	cial	Seq	uenc	e:re	vers	e pr	imer			
<400 aaaa			tgtt	ggcc	cc a	gtat	ggtg	a tc	at						*	34
<210 <211 <212 <213	> 1 > D	134 . Na	s sp													
<220 <221 <222 <223	> c > (1)														
<400 atg	gcg	aac	gct	agt	gag	ccg	ggc	ggc	ggc	ggc	ggc	ggg	gcc	gag	gct	48
Met 1				5					10				E 1	15		
gcc ; Ala ,	gcg Ala	Leu	ggc Gly 20	Leu	agg Arg	ctg Leu	Ala	Thr 25	ctc Leu	agc Ser	ctg Leu	ctg Leu	ctg Leu 30	tgc Cys	gtg Val	96
agc Ser	c t g Leu	gcg Ala	ggc	aac	gtg	ctg	ttc	gct	ctg	ctc	atc	gtg	agg	gag	cgc	144
		35	u 1 y	ASII			40	Ala	Leu	Leu	lle	Va I 45	Arg	Glu	Arg	
agc Ser I	ctg	35 cac	cgc	gcg	cct	tac	40 tac	ctg	ctg	ctc	gac	Val 45	tgc	ctg		192
agc (Ser I	ctg Leu 50	cac His	cgc Arg	gcg Ala	cct Pro	tac Tyr 55	tac Tyr	ctg Leu	ctg Leu ccg	ctc Leu	gac Asp 60	Val 45 ctg Leu	tgc Cys	ctg Leu	gcc Ala	192
Ser I gac I Asp (ctg Leu 50 ggg Gly	cac His ctg Leu	cgc Arg cgc Arg	gcg Ala gcg Ala	cct Pro ctc Leu 70	tac Tyr 55 gcc Ala	tac Tyr tgt Cys	ctg Leu ctc Leu	ctg Leu ccg Pro	ctc Leu gcc Ala 75	gac Asp 60 gtc Val	Val 45 ctg Leu atg Met	tgc Cys ctg Leu	ctg Leu gct Ala	gcc Ala gcg Ala 80	

Ly	s Le	u Lei	u Ala 100		e Leu	ı Ala	ı Ala	Leu 105		Cys	Phe	His	110		Phe	. •
c t i	g cti i Lei	g ctg Lei 115	ıGly	gtg Val	g ggc Gly	gto Val	acc Thr 120	Arg	tac Tyr	c t g Leu	gcc Ala	ato lle 125	Ala	cac His	cac His	384
cg(tto Phe 130	? Tyr	t gcc Ala	gag Glu	cgc Arg	ctg Leu 135	Ala	ggc Gly	tgg Trp	ccg Pro	tgc Cys 140	Ala	gcg Ala	atg Met	ctg Leu	432
gtg Val	Cys	gco Ala	gco Ala	tgg Trp	gcg Ala 150	Leu	gct Ala	t t g Leu	Ala	gcg Ala 155	gcc Ala	ttc Phe	ccg Pro	ccg Pro	gtg Val 160	480
ctg Leu	gaq Asp	ggc Gly	ggt	ggc Gly 165	Ala	gac Asp	gac Asp	gag Glu	gat Asp 170	gcg Ala	ccg Pro	tgc Cys	gcc Ala	ctg Leu 175	gag Glu	528
cag Gin	cgg Arg	ccc Pro	Rac Asp 180	Gly	gcc Ala	ccg Pro	ggt Gly	gcg Ala 185	Leu	ggc Gly	ttc Phe	ctg Leu	ctg Leu 190	ctc Leu	ctg Leu	576
gcc	gcg Ala	gtg Val 195	Val	ggc Gly	gcc Ala	acg Thr	cac His 200	ctc Leu	gtc Val	tac Tyr	ctt Leu	cgc Arg 205	ctg Leu	ctc Leu	ttc Phe	624
t t c Phe	atc lle 210	His	gac Asp	cgc Arg	cgc Arg	aag Lys 215	atg Met	cgg Arg	ccc Pro	gca Ala	cgc Arg 220	ctg Leu	gtg Val	ccc Pro	gcc Ala	672
gtc Val 225	Ser	cac His	gac Asp	tgg Trp	acc Thr 230	ttc Phe	cac His	ggc Gly	ccg Pro	ggc Gly 235	gcc Ala	acc Thr	ggt Gly	caa Gin	gcg Ala 240	720
gcc Ala	gcc	aac Asn	Trp	acg Thr 245	gcg Ala	ggc Gly	ttc Phe	ggc Gly	cgc Arg 250	ggg Gly	ccc Pro	acg Thr	cca Pro	cct Pro 255	gcg Ala	768
ctc Leu	gtg Val	ggc Gly	atc ile 260	agg Arg	cct Pro	gca Ala	ggc Gly	ccg Pro 265	ggc Gly	cgc Arg	gga Gly	gcc Ala	cgg Arg 270	cgc Arg	ctc Leu	816
ctg Leu	gtg Val	ctg Leu 275	gag Glu	gaa Glu	ttc Phe	Lys	acg Thr 280	gag Glu	aag Lys	agg Arg	ctg Leu	tgc Cys 285	aag Lys	atg Met	ttc Phe	864
tac Tyr.	gcc Ala 290	atc lle	acg Thr	ctg Leu	Leu	ttc Phe 295	ctg Leu	ctc Leu	ctc Leu	Trp	888 Gly 300	ccc Pro	tat Tyr	gtg Val	gtt Val	912
gcc Ala 305	agt Ser	tac Tyr	ctg Leu	Arg	gtc Val 310	ctg Leu	gtg Val	cgg Arg	Pro	gga Gly 315	gct Ala	gtc Val	ccg Pro	cag Gln	gcc Ala 320	960
tac	ctg	aca	gcc	tcg	gtg	tgg	ctg	aca	ttc	gca	cag	gcc	ggc	atc	aac	1008

Tyr Leu Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gin Ala Gly ile Asn 325 330 ccc gtg gtg tgt ttc ctc ttc aac cgg gag ctg agg gac tgt ttc aga Pro Val Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg gee eag tte eee tgt tge eag age eee eag gee acg eag gee acc etc 1104 Ala Gin Phe Pro Cys Cys Gin Ser Pro Gin Ala Thr Gin Ala Thr Leu 360 ccc tgc gac ctg aaa ggc att ggt ttg tga 1134 Pro Cys Asp Leu Lys Gly He Gly Leu <210> 22 <211> 377 <212> PRT (213) Rattus sp. **<400> 22** Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Ala Ala Ala Leu Giy Leu Arg Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu Ile Val Arg Glu Arg Ser Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala-Arg Arg Ala Ala Ala Ala Gly Thr Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe 100 105 Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala lle Ala His His 115 Arg Phe Tyr Ala Glu Ar~ Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu Val Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val 150 Leu Asp Gly Gly Ala Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu

. . 170 . .

Gin Arg Pro Asp Giy Ala Pro Giy Ala Leu Giy Phe Leu Leu Leu Leu

17/24 180 185 190 Ala Ala Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe 200 Phe lle His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala 210 Val. Ser His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala 230 235 Ala Ala Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala 250 Leu Val Gly lle Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu 265 Leu Val Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe 275 280 Tyr Ala lle Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val 295 Ala Ser Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gln Ala 310. 315 Tyr Leu Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gin Ala Gly lie Asn 325 Pro Val Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg 340 Ala Gin Phe Pro Cys Cys Gin Ser Pro Gin Ala Thr Gin Ala Thr Leu 360 Pro Cys Asp Leu Lys Gly lle Gly Leu 370 <210> 23 <211> 1113 <212> DNA <213 Rattus sp. <220> <221> CDS **<222> (1).. (1110)** <223> Rat SREB2 **<400> 23** atg gcg aac tat agc cat gca gct gac aac att ttg caa aat ctc tcg 48 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Asn Leu Ser 10

cct cta aca gcc ttt ctg aaa ctg act tcc ttg ggt ttc ata ata gga 96 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe lle lle Gly

20 25 gtc agt gtg gtg ggc aac ctt ctg atc tcc att ttg cta gtg aaa gat Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp ang accitig cat agaiget eet tac tac tie etg etg gat etg tige tige 192 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys tca gac atc ctc aga tct gca att tgt ttt cca ttt gta ttc aac tct Ser Asp IIe Leu Arg Ser Ala IIe Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser gtc aaa aat ggc tot acc tgg act tac ggg act ctg act tgc aaa gtg Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val att gcc ttt ctg ggg gtt ttg tcc tgt ttc cac act gcc ttc atg ctc. 336 lle Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu 105 tto tgc atc age gtc acc aga tac tta gcc atc gcc cat cac cgc ttc 384 Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg Phe tat aca aag agg ctg acc ttt tgg acg tgt ttg gct gtg atc tgc atg Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val lle Cys Met 130 gtg tgg act ctg tct gtg gcc atg gca ttt ccc cca gtt tta gat gta Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val 145 ggc acc tac tca ttc att agg gag gag gat cag tgt acc ttc caa cac Gly Thr Tyr Ser Phe lie Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His ege tee the agg get age gat tee eta gga tit atg etg etc ett get Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala ctc atc ctc cta gcc aca cag ctt gtc tac ctc aag ctg ata ttt ttt 624 Leu lie Leu Leu Ala Thr Gin Leu Val Tyr Leu Lys Leu lie Phe Phe 195 gtc cac gat cga agg aaa atg aag cca gtc cag tit gta gca gca gtg 672 Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gin Phe Val Ala Ala Val 210 agt cag aac tgg acc ttt cat ggc cct gga gct agt ggc cag gca gct Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Ala Ala gcc aat tgg cta gca gga ttt gga agg ggt ccc aca cca ccc acc ttg

Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu

												٠.				
,				245	i .			-	250)				255	j <u>.</u>	
ctg Leu	g gg I Gly	ate	c agg e Arg 260	Gļn	aat Asn	gcg Ala	aat Asn	acc Thr 265	Thr	ggc Gly	aga Arg	aga Arg	cgg Arg 270	ctc Leu	ttg Leu	816
gtt Val	t t g Lei	gai Asp 275		ttc Phe	aaa Lys	atg Met	gag Glu 280	Lys	aga Arg	atc le	agc Ser	aga Arg 285	Met	t t c Phe	tat Tyr	864
a ta I I e	a t g Me (290	Thr	t ttc Phe	ctc Leu	t t c Phe	cta Leu 295	Thr	ttg Leu	tgg Trp	ggt Gly	ccc Pro 300	tac Tyr	c t g Leu	gtg Vai	gcc Ala	912
tgc Cys 305	Tyr	t gg Trp	g aga Arg	gtt Val	ttt Phe 310	gca Ala	aga Arg	ggg Gly	cct Pro	gta Val 315	Val	cca Pro	ggg Giy	gga Gly	ttt Phe 320	960
cta Leu	aca Thr	gcc Ala	gct	gtc Val 325	tgg Trp	atg Met	agt Ser	ttc Phe	gcc Ala 330	caa Gin	gca Ala	gga Gly	atc lie	aat Asn 335	ccc Pro	100
ttt he	gtc Val	tgc Cys	att lle 340	t t c Phe	tcc Ser	aac Asn	agg Arg	gag Glu 345	ctg Leu	agg Arg	cgc Arg	tgt Cys	ttc Phe 350	agc Ser	aca Thr	105
icc Thr	ctt Leu	ctt Leu 355	tac Tyr	tgc Cys	aga Arg	aaa Lys	tcc Ser 360	agg Arg	t ta Leu	cca Pro	agg Arg	gaa Glu 365	cct Pro	tac Tyr	tgt Cys	110
	ata lie 370	tga				•								. 2:	-	111;
(211 (212	0> 2 1> 3 2> P 3> R	70 RT	s sp.		1	•	· ·	· ·.		Φ Φ	*				*	
)> 2		o sp.			9	Ÿ								*	
			Tyr	Ser 5	His	Ala	Ala	Asp	Asn 10		Leu	Gin	Asn	Leu 15	Ser	
ro	Leu	Thr	Ala 20	Phe	Leu	Lys	Leu	Thr 25	Ser	Leu	Gly	Phe	11e 30	lle	Gly	
a I	Ser	Val 35	Val	Gly	Asn	Leu	Leu 40	lle	Ser	lle	Leu	Leu 45	Val	Lys	Asp	,
уs	Thr 50	Leu	His	Arg	Ala	Pro 55	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Leu 60	Asp	Leu	Cys	Cys	•
er	Asp	He	Leu	Arg	Ser	Ala	He	Cys	Phe	Pro	Phe	Val	Phe	Asn	Ser	

Val lle 370

20/24

Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val lle Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu 100 Phe Cys lie Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala IIe Ala His His Arg Phe Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val lle Cys Met Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val Gly Thr Tyr Ser Phe lle Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His 165 Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala Leu lle Leu Leu Ala Thr Gin Leu Val Tyr Leu Lys Leu lle Phe Phe Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gin Phe Val Ala Ala Val Ser Gin Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gin Ala Ala Ala Asn Tro Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu Leu Gly lle Arg Gln Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Arg Leu Leu Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg He Ser Arg Met Phe Tyr. 275 280 lle Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala . . . Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 310 Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gin Ala Gly ile Asn Pro Phe Val Cys lie Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys

			•	4.7 L						-		, .				
(21	0> 2	25 -	٠.				**					:	· · ·		. * .	
	1>															
	2> [***								,	11 2 2 A	
		Rato	0707	ávir									-	*		
\21	3/ 1	iai i	01011	IAVII,	us .					•					·,·	
(22	^ 0\															•
	1> (יחכ -		211	:											-
		.us (1)	/111	۵)						*	1					, 0
-	- 1	Rat S		-							· · .	1				*
\22	3/ n	tat 3	VED3					2	-							
/40	0> 2	· ·		. 1		•				. •		141				
						ن را خاماند										40
														ctg		48
MEL	MIA	. WZII	THE	IIII	GIY	GIU	Pro	GIU	40	Val	Ser	ыу	Ala	Leu	Ser	
. 1				. 3		,			10			0	100	15	٠.	
		+	~~~	+ 00	~~+		~ • ~			- 4 -		- 4		44		0.0
Lau	Dro	Cor	Ala	Car	Ala	Tur	Val	lue	il au	RIE	Lig	CIE	gga	ctg Leu	atc	96
Leu	FIU	361	20		nia	ı yı	Val	Lys 25	Leu	Val	Leu	ren		Leu	ite	
		, 1	20	100	,			20					30			
	+ ~ +	~+~	200		~~~					44-						
																144
WEL	Cys	35		Leu	Ala	GIY	ASII	AIZ	He	Leu	3er	Leu	Leu	Val	Leu	
•	i Tang	35					40			٠		40			- 1,	
220												- 4 -	أعت	211		100
luc	Clu	Ara	Ala	Lau	Lac	aag	RCI	CCL	Tue	Tac	TII.	CIE	cig	gac Asp	CIE	192
. L. J. 2	50		HIA	Leu	U1.2		AIZ	Lio	ıyr	ıyr		ren	reu	ASD	Leu	٠,
	. 30			· · · .		55					-60					
inc	cta		42.	~~~		000		***			44.					0.40
														Val		240
65	Leu	Ara	w2b	GIY	70	Arg	261	Ala	116	- E - E	rne	Pro	Pne	vai		4
. 03	÷.				10					75					80	, d.
act	+ ~ +	:	~~~	+	~~~	*				44.	5_4			السا	A A	000
Ala	Car	Na I	VEC	·Ui.	RRC	200	Sol	Tes	acc	DLA	agt	gca	ÇŢĞ	agc Ser	tgt	288
nia	361	741	VI Ř	.пт. 185		361	361	HP	1111	rne	ser	AIZ	Leu		Ç y Ş	
*	e	• .		. 03	-				30	: .				95		
220	211	ata	acc	+++	210	~~ 1	***	-+-				1				220
lve	ه ا ا	Val	Ala	Dha	u i g	Ala	RIB	Làu	Dha	Cue	Dha	uia	RCR	gcc Ala	iliç Din	336
Ljs	116	101	100	1116	me t	πια	Val	105	FIIE	Cys	riie	піз		Ala	rne	÷
4 1 1 14			100				* ***	103	,		•	•.	110	* •		
ato	. c t à	++0	tác	910	200	a to	200	6.00	+		~~~	i.		cac		204
														His		384
IIIC L	LCu	115		116	361	vai	120	VIR	ıyı	MEL	Ala	_0	Ala	піз	піз	
		113					120		i.	,		125	٠.	• '		
	++0	+ 2 +	~~~	220										_4_		420
Ara	Dha	Tur	Ala	aag	Lgu	alg	The	1	TES	aca	Circ	gca	gct	gtc	atc	432
AI E	130	1 7 1	MIA	Lys	VIE		tit	Leu	irp	INT		Ala	Ala	Val.	116	
	130					135					140	*	ή,	. ,	•.	
							_		200		A F =					400
rRc	alg	RCC	rgg	acc	ttg	TOT	gtg	gcc	atg	gct	TTC	cca	cct	gtc	TTT.	480
	met	AIA	ПЪ	inr		26L	val	Ala	Met		Phe	Pro	Pro	Val		
145	• `				150					155	. *			:	160	
	- 4 -			4					•				_			
gat	gtg	ggc	acc	tac	aag	ttt	atc	cga	gag	gag	gac	cag	tgc	atc	ttt.	528
ASD	vai	ыу	inr		Lys	rne	ile	Arg		Glu	Asp	Gin	Cys	He	Phe	•
	• • .			165					170					175	0	

		Cys	Val						-			i '' 19 9.			** ** *** **	1166
CCC	tac		gtc	ate	tga	000	300		,			365				1122
act Thr	His	gcc Ala 355	cct Pro	tgc	tgg Trp	ggc Gly	Thr 360	gga Gly	ggt Giy	gcc Ala	cca Pro	Ala	ccc Pro	aga Arg	gaa Glu	1104
			340	· .		•		345			70	· 	350			
cca Pro	atc	gtc Val	tgc Cys	t t c Phe	ctg Leu	ctt Leu	aac Asn	aag Lvs	gac Asn	ctc	aag	aag	tgc Cve	ctg	agg Arg	1056
Tyr	Leu	Ala	Thr	Ala 325	Val	Trp	Met	Ser	Phe 330	Ala	Gin	Ala	Ala	Val 335	Asn	
		gcc	act	gct	٠,,,,,	tgg	atg	agc	ttc	٠.,	cag	ec t	ect	etc	320	1008
gcc Ala 305	Cys	tac Tyr	tgg Trp	cga Arg	gtg Val 310	ttt Phe	gtg. Val	aaa Lys	gcc Ala	tgc Cys 315	gc t Ala	gtg Val	ccc Pro	cac His	Arg	960
*	290					295					300		*		· ·	
tac Tvr	gcg Ala	att lle	aca Thr	ctg	ctc	t t c	ctg	ctc	ctc	tgg	tca	cca	tac	att	gtg	912
Leu	Gly	Me t 275	Asp	Glu	Val	Lys	Gly 280	Ğlu	Lys	Gin	Leu	Gly 285	Arg	Met	Phe	
ctg	ggc	atg	260 gac		gtc	aag	ggt	265 gaa	aag	cag	cte	eec	270 cga	atø	ttc	864
act Thr	ctg Leu	c t g Leu	Gly	lle	cgg Arg	cag Gin	aa t As n	Gly	cat His	gca Ala	gct Ala	agc Ser	Arg	cgg Arg	cta Leu	816
АГа	Ala	АГа	ASN	245	116	, A I a	Gly	Phe	G1y 250	Arg	Gly	Pro	Met	Pro 255	Pro	
gct	gct	gcc	aac	tgg	atc	gct	ggc	ttt	ggc	cgt	ggg	ccc	atg	cca	cca	768
Ala 225	lle	Ser	GIn	Asn	Trp 230	Thr	Phe	His	Gly	Pro 235	Gly	Ala	acc	ggc Gly	cag Gin 240	720
	210					215				*	220		*			
c t c	Phe	Glu	tat Tyr	cgt Arg	cac His	cgc Arg	aag Lys	atg Met	aag Lys	cca Pro	gtg	cag Gin	atg Met	gtg Val	ccc	672
Leu	J- Ala	195	Leu	Met	Ala	Ala	Thr	His	Ala	Val	Tyr	Gly	Lys	Leu	Leu	
tte	g gc	gtg	cto	atg	gca	gcc	aca	cat	gct	gto	tat	ggo	aag	ctg	cta	624
Glu	g ca u His	c cgc	tac Tyr 180	Phe	: aaa : Lys	ı gça . Ala	aa 1 Asr	gad Asp 185	Thr	Lei	r Gly	tti Phe	atg Met 190	Leu	atg Met	576

<212> PRT
<213> Rat coronavirus

<400> 26

Met Ala Asn Thr Thr Gly Glu Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Ser 1 5 10 15

Leu Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Val Lys Leu Val Leu Leu Gly Leu lle 20 25 30

Met Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Ala IIe Leu Ser Leu Leu Val Leu 35 40 45

Lys Glu Arg Ala Leu His Lys Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu 50 55 60

Cys Leu Ala Asp Gly lle Arg Ser Ala lle Cys Phe Pro Phe Val Leu 65 70 75 80

Ala Ser Val Arg His Gly Ser Ser Trp Thr Phe Ser Ala Leu Ser Cys 85 90 95

Lys lie Val Ala Phe Met Ala Val Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe 100 105 110

Met Leu Phe Cys IIe Ser Val Thr Arg Tyr Met Ala IIe Ala His His 115 120 125

Arg Phe Tyr Ala Lys Arg Met Thr Leu Trp Thr Cys Ala Ala Val lle 130 135 140

Cys Met Ala Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Phe 145 150 155 160

Asp Val Gly Thr Tyr Lys Phe lie Arg Glu Glu Asp Gln Cys lie Phe 165 170 175

Glu His Arg Tyr Phe Lys Ala Asn Asp Thr Leu Gly Phe Met Leu Met 180 185 190

Leu Ala Val Leu Met Ala Ala Thr His Ala Val Tyr Gly Lys Leu Leu 195 200 205

Leu Phe Glu Tyr Arg His Arg Lys Met Lys Pro Val Gin Met Val Pro 210 215 220

Ala lle Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln 225 230 235 240

Ala Ala Ala Asn Trp lie Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Met Pro Pro 245 250 255

Thr Leu Leu Gly Ile Arg Gln Asn Gly His Ala Ala Ser Arg Arg Leu 260 265 270

Leu Gly Met Asp Glu Val Lys Gly Glu Lys Gln Leu Gly Arg Met Phe

WO 99/46378 PCT/JP99/01191

24/24

275

280

285

Tyr Ala lie Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr lie Val 290 295 300

Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg 305 310 315 320

Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gin Ala Ala Val Asn 325 330 335

Pro 11e Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg 340 345 350

Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu 355 360 365

Pro Tyr Cys Val Met

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01191

A. CLAS	SIFICATION OF SUBJECT MATTER .Cl ⁶ Cl2N15/12, C07K14/705, C	12P2	1/02, C07K16/28	
According	to International Patent Classification (IPC) or to both	nation	al classification and IPC	*
	OS SEARCHED			
Minimum o	documentation searched (classification system follows . C1 ⁶ C12N15/12, C07K14/705, C	d by cl	assification symbols) 1/02, C07K16/28	
Documenta	tion searched other than minimum documentation to	the exte	ent that such documents are include	ed in the fields searched
·		• • •		
Electronic d Gent	data base consulted during the international search (noank/EMBL/DDBJ/GeneSeq	ame of	data base and, where practicable, s	earch terms used)
		THE .		
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where a			Relevant to claim No.
A	US, 5508384, A (Univ. New Y 16 April, 1996 (16. 04. 96)	ork (Fa	State), amily: none)	1-8
A	The Journal of Neruoscience Guoping Feng et al., "Cloning characterization of a novel Drosophila melanogaster" p.:	ng ai Dopa	nd functional amine receptor from	1-8
A	FEBS Letters Vol. 355 No. 3 Stephen Rees et al., "Clonin of the human 5-HT5A serotoni	g an	d characterisation	1-8
				0
**				
			*	
		* a =	*	*
Furthe	er documents are listed in the continuation of Box C.		See patent family annex.	
"A" docume considered artier docume cited to special r docume means "P" docume the prior	categories of cited documents: Int defining the general state of the art which is not ed to be of particular relevance locument but published on or after the international filing date int which may throw doubts on priority claim(s) or which is establish the publication date of another citation or other reason (as specified) int referring to an oral disclosure, use, exhibition or other int published prior to the international filing date but later than ity date claimed ctual completion of the international search tine, 1999 (15.06.99)	"Y" "&" Date	later document published after the intermediate and not in conflict with the applicant the principle or theory underlying the important of particular relevance; the claronsidered novel or cannot be considered when the document is taken alone document of particular relevance; the claronsidered to involve an inventive step we combined with one or more other such doeing obvious to a person skilled in the adocument member of the same patent fair of mailing of the international sear 22 June, 1999 (22.	ion but cited to understand vention aimed invention cannot be d to involve an inventive step simed invention cannot be when the document is occuments, such combination art mily
<u>.</u>				
Name and ma	ailing address of the ISA/ nese Patent Office	Autho	orized officer	
oapai	rese raceur Ollica			
Pareimila Ma		Tolan	hone No	

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類 (IPC))

Int. Cl° C12N 15/12, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl° C12N 15/12, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

	C. 関連す	ると認められる文献	
- 1	引用文献の	く ロン・ソフィッツ 入版	(X)
	カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	A	US, 5508384, A (Univ. New York State) 16.4月.1996 (16.04.96) パテントファミリーなし	1-8
	A	The Journal of Neruoscience Vol. 16 No. 12 (1996) Guoping Feng et al. "Cloning and functional characterization of a novel Dopamine receptor from Drosophila melanogaster" p. 3925-3933	1-8
	1	FEBS Letters Vol. 355 No. 3 (1994) Stephen Rees et al. "Cloning and characterisation of the hum an 5-HTm serotonin receptor" p. 242-246	1-8
_			** ***********************************

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

- * 引用文献のカテゴリー
- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す もの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日 以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する 文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって て出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理 論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明 の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以 上の文献との、当業者にとって自明である組合せに よって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.06.99

国際調查報告の発送日 22.06.99

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員) 小暮 道明

4B 9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



Europäisches Patentamt

Eur pean Pat nt Offic

Offic europé n des brevets



EP 1 067 183 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

published in accordance with Art. 158(3) EPC

- (43) Date of publication: 10.01.2001 Bulletin 2001/02
- (21) Application number: 99939146.9
- (22) Date of filing: 11.03.1999

- (51) Int. CI.7: C12N 15/12, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28
- (86) International application number: PCT/JP99/01191
- (87) International publication number: WO 99/46378 (16.09.1999 Gazette 1999/37)
- (84) Designated Contracting States:

 AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU NL
 PT SE
- (30) Priority: 12.03.1998 JP 6024598 03.02.1999 JP 2677499
- (71) Applicant:
 YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
 Tokyo 103 (JP)
- (72) Inventors:
 - MATSUMOTO, Mitsuyuki, Yamanouchi Pharm. Co.,Ltd.
 Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)

- SUGIMOTO, Toru, Yamanouchi Pharmaceuticai Co.,Ltd. Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
- TAKASAKI, Jun, Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd. Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
- SAITO, Tetsu, Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd. Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
- KOBAYASHI, Masato, Yamanouchi Pharm. Co.,Ltd. Tokyo 174-8612 (JP)
- (74) Representative: HOFFMANN EITLE
 Patent- und Rechtsanwälte
 Arabellastrasse 4
 81925 München (DE)

(54) NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEINS

(57) This invention belongs to the genetic engineering field, and provides novel G protein-coupled receptor family proteins SREB1, SREB2 and SREB3 expressed in the central nervous system, genes coding for said proteins, vectors containing said genes, host cells containing said vectors, processes for producing said G protein-coupled receptor proteins, screening methods using said G protein-coupled receptor proteins, antibodies for said G protein-coupled receptor proteins, and screening methods using said antibodies.

Representative method for obtaining the G proteincoupled receptor proteins of the present invention:

The reverse transcriptase-polymerase chain reaction (to be referred to as RT-PCR hereinafter) is used f r obtaining the G protein-coupled receptor proteins of the present invention. mRNA is extracted from human or rat brain tissue or brain-derived cells. Then, using the mRNA as the template and using two primers interposing the entire portion or a part of the G protein-coupled receptor protein translation region, RT-PCR is carried out to obtain cDNA corresponding to the G protein-coupled receptor protein or a part thereof. Then, the resulting cDNA of the novel C protein-coupled receptor

protein or a part thereof is ligated into an appropriate expression vector and expressed in a host cell to produce said G protein-coupled receptor protein.

D scripti n

Technical Field

This invention belongs to the genetic engineering field, and relates to novel G protein-coupled receptor proteins, genes coding for these G protein-coupled receptor proteins, methods for producing these G protein-coupled receptor proteins, screening methods using these G protein-coupled receptor proteins, antibodies for these G protein-coupled receptor proteins and screening methods using these antibodies.

10 Background Art

[0002] Cell membrane receptors which transmit signals to the intracellular region via the activation of heterotrimeric GTP binding protein are generally referred to as "G protein-coupled receptor". All members of the G protein-coupled receptor known to date are sometimes referred generally to as "seven transmembrane receptor", because they form a super family having a common structure which has the extracellular amino terminus and intracellular carboxyl terminus and passes through the cell membrane seven times. The G protein-coupled receptor transmits information on various physiologically active substances from cell membranes to the intracellular region via activation of heterotrimeric GTP binding protein and subsequent changes in the intracellular second messengers induced. As the intracellular second messengers which are controlled by the heterotrimeric GTP binding protein, cAMP via adenylate cyclase, Ca⁺⁺ via phospholipase C and the like are well known, and it has been revealed recently that many cellular proteins are their targets, such as the control of channels and activation of protein kinases via the heterotrimeric GTP binding protein (Gudermann, T. et al. (1997), Annu. Rev. Neurosci., 20, 399 - 427). The physiologically active substances that transmit information via the G protein-coupled receptor include various known physiologically active substances such as neurotransmitters, hormones, chemokine, lipid-originated signal transducers, divalent ions and proteases. Information by these physiologically active substances is transmitted to the intracellular region through their specific G protein-coupled receptor, respectively.

[0003] Several hundred types of G protein-coupled receptor have so far been cloned from eucaryote. Regarding human, hundred or more types of G protein-coupled receptor for corresponding endogenous ligands have been cloned and are regarded as targets of drugs for diseases. There are various diseases in which G protein-coupled receptor is the target, and there exist effective drugs which act upon G protein-coupled receptor, in the respective fields of central nervous system, circulatory organ system, inflammatory immune system, digestive organ system, motor organ system and urinary organ/reproductive organ system (Stadel, J. et al. (1997), Trends Pharmacol. Sci., 18, 430 - 437). This indicates that agonists or antagonists of G protein-coupled receptor have a high possibility of becoming a therapeutic agent of diseases, so that studies are being actively carried out on the discovery and identification of new G protein-coupled receptors.

[0004] Cloning of G protein-coupled receptor genes tends to start based on their structural homology in the super family in many cases, and a receptor having no correspondence to endogenous ligand is referred to as "the orphan G protein-coupled receptor". In general, a ligand specific for the orphan G protein-coupled receptor has not been found, so that it was difficult to develop its agonist or antagonist. In recent years, however, it has been proposed to create a drug targeting for the orphan G protein-coupled receptor by combining the substantiated compound libraries and high performance high throughout screening (Stadel, J. et al. (1997), Trends Pharmacol. Sci., 18, 430 - 437).

[0005] That is, it is possible to screen an agonist for an orphan G protein-coupled receptor from a compound library by effective high throughput system of the measurement of cAMP and Ca⁺⁺ which are second messengers of many G protein-coupled receptors, or the measurement of GTPase activity and G protein binding of GTP γ S which are indexes of the activation of heterotrimeric GTP binding protein, so that it is possible to find specific agonists and antagonists making use of such compounds and furthermore to develop therapeutic drugs for certain diseases. Under such conditions, discovery of a novel G protein-coupled receptor capable of becoming a new therapeutic target of diseases is regarded as the most important step in creating a medicament which acts upon G protein-coupled receptors.

[0006] Among G protein-coupled receptors, there is a case in which a plurality of receptors are present for one endogenous ligand. Such receptors are referred to as receptor family, and each receptor is called subtype. Since all of the G protein-coupled receptors have a common structure which passes through the cell membrane s ven tim s, 20 to 25% of amino acids are preserved mainly in the transmembrane region even in mutually independent G protein-coupled receptors, but when they form a receptor family, ratio of the amino acids preserved among its subtypes significantly increases to 35% or more, particularly to 60 to 80% among subtypes having high relevancy (Strader, C.D. et al. (1994), Annu. Rev. Biochem., 63, 101 - 132).

[0007] When development of a therapeutic drug for diseases is planned by targeting for an endogenous ligand wherein a receptor family is present, specificity of its subtypes becomes important in many cases. This is because actions upon other subtype than actions upon a subtype that mediates the main action of a drug lead to side effects in

many cases. Accordingly, it is desirable to create a subtype-specific agonist or antagonist, but it is necessary to find a means for detecting the subtype-specificity for that purpose. Currently, a method for constructing a system in which a gene of a subtype is cloned and its specificity is detected using a cultured cell line or the like which expresses the gene is generally used.

[0008] When a novel G protein-coupled receptor is used as the target of disease treatment, it is highly possible that the subtype-specificity is important, so that discovery of a receptor family is important also in the case of the novel G protein-coupled receptor. The homology of amino acid sequences among independent G protein-coupled receptors is 20 to 25% as a whole, but when they form a receptor family, the homology significantly increases in general in the family, so that it is possible to presume whether they form a family or not, by comparing homology between two G protein-coupled receptors. It is possible to find novel G protein-coupled receptors which form a family, making use of such a means, and when a novel G protein-coupled receptor family is discovered, it will open a way for developing a drug for disease therapy because of the possibility of creating a subtype-specific agonist or antagonist.

[0009] The central nervous system transmits and controls various kinds of information using physiologically active substances represented by neurotransmitters. The G protein-coupled receptor is taking an important role in the signal transduction and control. Since many types of G protein-coupled receptor are present in the central nervous system, they are used as important therapeutic targets for diseases of the central nervous system. For example, it is considered that the G protein-coupled receptor of a neurotransmitter, dopamine, is a therapeutic target of schizophrenia (Seeman, P. et al. (1997), Neuropsychopharmacology, 16, 93 - 110), the G protein-coupled receptor of serotonin is that of depression (Cowen, P.J. (1991), Br. J. Psychiatry, 159 (Suppl. 12), 7 - 14), and the G protein-coupled receptor of neuro-peptide Y is that of eating disorder (Blomqvist, A.G. and Herzog, H. (1997), Trends Neurosci., 20, 294 - 298).

[0010] It is considered that a novel G protein-coupled receptor expressing in the central nervous system, preferably a human receptor, will lead to a candidate for a new therapeutic target of central nervous system diseases or to the elucidation of central nervous system functions. In addition, for the purpose of developing a subtype-specific drug, it is desirable also to find a family in the case of the novel G protein-coupled receptor expressing in the central nervous system. Though the gene of a receptor GPR27 obtained from a mouse, having high homology with the amino acid sequence of SREB1 which is one of the G protein-coupled receptors of the invention, and an amino acid sequence based on its gene sequence have been reported (O'Dowd, B.F. et al. (1998), Genomics, 47, 310 - 313), no information is available to date concerning gene sequence and amino acid sequence of a human receptor.

30 Disclosure of the Invention

45

50

55

[0011] The present invention is to provide novel G protein-coupled receptor family proteins expressed in the central nervous system, as the target of therapeutic agents for central nervous system diseases.

[0012] With the aim of achieving the above object, the present inventors have conducted intensive studies and, as a result, succeeded in isolating genes (SREB1, SREB2, SREB3, rSREB1, rSREB2 and rSREB3) which encode nov I G protein-coupled receptor family proteins expressed in the central nervous system.

[0013] Also, we have established vectors containing these genes, host cells containing these vectors and methods for producing these G protein-coupled receptor proteins using such host cells, and rendered possible screening of these G protein-coupled receptor proteins and compounds, peptides and antibodies capable of modifying activities of the G protein-coupled receptor proteins.

[0014] Illustratively, the present invention relates to

(1) a G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26, or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to the protein,

preferably a human origin G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4 or 6 or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to the protein, or a rat origin G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 6, 22 or 26 or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to the protein,

- (2) a G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26.
- (3) a gene which has a nucleotide sequence coding for the G protein-coupled receptor protein described in the item (1),
- (4) a vector which contains the gene described in the item (3),
- (5) a host cell which contains the vector described in the item (4),
- (6) a method for producing the G protein-coupled receptor protein described in the item (1) or (2), or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to the protein, which comprises using the host cell described in the item (5),
- (7) a method for screening a medicament acting on the G protein-coupled receptor protein described in the item (1)

- or (2), which comprises allowing the G protein-coupled receptor protein to contact with a compound to be tested, or (8) an antibody for the G protein-coupled receptor protein described in the item (1) or (2) or a partial peptide thereof.
- [0015] The following explains the terms to be used herein.
- [0016] The term "human origin" or "rat origin" means an amino acid sequence identical to the amino acid sequence of a G protein-coupled receptor protein expressing in human or rat.
- [0017] The term "equivalent" of the G protein-coupled receptor protein of the present invention means a G protein-coupled receptor protein which is expressed in the central nervous system and shows the same activity of any one of the G protein-coupled receptor proteins represented by the amino acid sequences described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26.
 - [0018] In this connection, the G protein-coupled receptor and the G protein-coupled receptor protein have the same meaning.
- [0019] The novel G protein-coupled receptor protein of the present invention is any one of the G protein-coupled receptor proteins represented by the amino acid sequences described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 and 26, or equivalents thereof. Illustratively, all of G protein-coupled receptor proteins are included in the invention as long as they have the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26, or an amino acid sequence in which the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26, has substitution, deletion or insertion of one or a plurality, preferably from 1 to 10, more preferably from 1 to 7, most preferably from 1 to 5, of amino acids, and have the same activity of the protein represented by the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4 or 6. Preferably, it is a human or rat origin G protein-coupled receptor protein having the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26.
- [0020] Also, the gene which has a nucleotide sequence coding for the novel G protein-coupled receptor protein of the invention may be any gene, as long as it has a nucleotide sequence coding for the G protein-coupled receptor protein represented by the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4 or 6, or an equivalent thereof. Preferably, it is a gene which has a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26. More preferably, it is a gene which has a sequence of from 1 to 1,125 positions of the nucleotide sequence described in Sequence No. 1, from 1 to 1,110 positions of the nucleotide sequence described in Sequence No. 3, from 1 to 1,119 positions of the nucleotide sequence No. 5, from 1 to 1,131 positions of the nucleotide sequence described in Sequence No. 21, from 1 to 1,110 positions of the nucleotide sequence described in Sequence No. 23 or from 1 to 1,119 positions of the nucleotide sequence described in Sequence No. 25.
- [0021] The gene which encodes the G protein-coupled receptor protein of the invention can be obtained by the following methods.
- 1) Production methods of novel G protein-coupled receptor protein gene
- a) First production method
- [0022] A mRNA sample is extracted from human cells or tissue having the ability to produce the G protein-coupled receptor protein of the invention. Next, using this mRNA as the template, two primers interposing the G protein-coupled receptor protein mRNA or a part of the mRNA region is prepared. The G protein-coupled receptor protein cDNA or a part thereof can be obtained by carrying out a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (to be referred to as RT-PCR hereinafter) suited for SREB1, SREB2 or SREB3 by modifying the conditions for denature temperature, denaturing agent addition and the like. Thereafter, the receptor protein can be produced by integrating the thus obtained G protein-coupled receptor cDNA or a part thereof into an appropriate expression vector and expressing it in a host cell.
- [0023] Firstly, mRNA molecules including those encoding the G protein-coupled receptor protein of the invention are extracted by a known method from cells or tissue, such as of the human brain or rat brain, having the ability to produce the protein. Regarding the extraction method, a guanidine thiocyanate hot phenol method, a guanidine thiocyanate-guanidine hydrochloride method and the like can be exemplified, and a guanidine thiocyanate cesium chloride method can be cited as a preferred method. The cells or tissue having the ability to produce the protein can be identified by the Northern blotting method using a gene having a nucleotide sequence coding for the protein or a part thereof or by the Western blotting method using an antibody specific for the protein.
- Purification of mRNA can be carried out in accordance with the conventional method, for example by adhering the mRNA to an oligo(dT) cellulose column and then eluting it therefrom. In addition, the mRNA can be further fractionated, for example, by a sucrose density gradient centrifugation. Alternatively, a commercially available already-extracted mRNA preparation may be used without carrying out the mRNA extraction.
- [0025] Next, a single-stranded cDNA is synthesized from the thus purified mRNA by carrying out a reverse transcriptase reaction in the presence of a random primer or an oligo-dT primer. This synthesis can be carried out in the conventional way. The novel G protein-coupled receptor DNA of interest is amplified by subjecting the thus obtained sin-

gle-stranded cDNA to PCR using two primers interposing a region of the gene of interest. The thus obtained DNA is fractionated, for example, by an agarose gel electrophoresis. As occasion demands, a DNA fragment of interest can be obtained by digesting the DNA with restriction enzymes and then connecting the digests.

b) Second production method

[0026] In addition to the above method, the gene of the invention can also be produced making use of conventional genetic engineering techniques. Firstly, single-stranded cDNA is synthesized using the mRNA obtained by the above method as the template and a reverse transcriptase, and then double-stranded cDNA is synthesized from the single-stranded cDNA. Examples of the method include the S1 nuclease method (Efstratiadis, A. et al. (1976), Cell, 7, 279 - 288), the Land method (Land, H. et al. (1981), Nucleic Acids Res., 9, 2251 - 2266), the O. Joon Yoo method (Yoo, O.J. et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049 - 1053) and the Okayama-Berg method (Okayama, H. and Berg, p. (1982), Mol. Cell. Biol., 2, 161 - 170).

[0027] Next, the recombinant plasmid obtained by the above method is introduced into an *Escherichia coli* strain, such as DH5α, to effect its transformation, and a transformant can be selected making use of tetracycline resistance or ampicillin resistance as a marker. For example, when the host cell is *Escherichia coli*, transformation of the host cell can be carried out by the Hanahan's method (Hanahan, D. (1983), *J. Mol. Biol.*, 166, 557 - 580), namely a method in which the recombinant DNA is added to competent cells prepared in the presence of CaCl₂ and MgCl₂ or RbCl. In this case, not only a plasmid but also a lambda or the like phage vector can also be used as the vector.

[0028] A strain having DNA coding for the novel G protein-coupled receptor protein of interest can be selected from the thus obtained transformants, for example by the following various methods.

(1) A screening method which uses a synthetic oligonucleotide probe

[0029] An oligonucleotide corresponding to the entire portion or a part of the G protein-coupled receptor protein of the invention is synthesized (in this case, it may be either a nucleotide sequence derived using the codon usage or a combination of plural possible nucleotide sequences, and in the latter case, their kinds can be reduced by including inosine), this is used as a probe (labeled with ³²P or ³³P) and allowed to hybridize with DNA samples of transformants, which are denatured and fixed on a nitrocellulose filter, and then a positive strain is screened and selected.

(2) A screening method which uses a probe prepared by polymerase chain reaction

[0030] Sense primer and antisense primer oligonucleotides corresponding to a part of the G protein-coupled receptor protein of the invention are synthesized, and polymerase chain reaction (Saiki, R.K. et al. (1988), Science, 239, 487 - 491) is carried out using a combination of them to effect amplification of a DNA fragment of interest coding for the entire portion or a part of the G protein-coupled receptor protein. As the template DNA to be used herein, cDNA synthesized by the reverse transcription reaction from mRNA of cells capable of producing the G protein-coupled receptor protein or genomic DNA can be used. The thus prepared DNA fragment is labeled with ³²P or ³³P and used as the probe to select a clone of interest by carrying out colony hybridization or plaque hybridization.

(3) A screening method in which the novel G protein-coupled receptor protein is produced in other animal cells

[0031] A transformant is cultured to amplify the gene of interest, the gene is transfected into an animal cell (in this case, either a plasmid which can perform autonomous replication and contains a transcription promoter region or a plasmid which can be integrated into chromosome of the animal cell may be used) and a protein coded by the gene is produced on the cell surface. By detecting the protein using an antibody specific for the G protein-coupled receptor protein of the invention, a strain of interest having cDNA coding for the G protein-coupled receptor protein is selected from the original transformants.

o. (4) A selection method which uses an antibody specific for the G protein-coupled receptor protein of the invention

[0032] In advance, cDNA is integrated into an expression vector and protein is produced on the surface of transformant strains, and then strains capable of producing the G protein-coupled receptor protein are detected using an antibody specific for the G protein-coupled receptor protein of the invention and a second antibody for the first antibody, thereby selecting a strain of interest.

(5) A method which uses a selective hybridization translation system

[0033] Samples of cDNA obtained from transformants are blotted on, for example, a nitrocellulose filter and hybridized with mRNA prepared from cells capable of producing the G protein-coupled receptor protein of the invention, and then the mRNA linked to the cDNA is dissociated and recovered. The thus recovered mRNA is then translated into protein using a protein translation system, for example by injecting into Xenopus oocyte or in a cell-free system such as a rabbit reticulocyte lysate, wheat germ or the like. A strain of interest is selected by detecting it using an antibody for the G protein-coupled receptor protein of the invention.

[0034] Collection of DNA which encodes the G protein-coupled receptor protein of the invention from the thus obtained transformant of interest can be carried out in accordance with a known method (Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY). For example, it can be carried out by separating a fraction corresponding to a plasmid DNA from cells, and cutting out a cDNA region from the plasmid DNA.

c) Third production method

[0035] The gene which has a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence represented by Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26 can also be produced by binding DNA fragments produced by a chemical synthesis method. Each DNA can be synthesized using a DNA synthesizer (e.g., Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman), 394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems) or the like).

d) Fourth production method

For the purpose of effecting expression of the function of G protein-coupled receptor protein of the invention. by the substance thus obtained by genetic engineering techniques making use of the gene of the invention, it is not always necessary to have all of the amino acid sequences represented by Sequence No. 2, 4, 6, 22 and 26; for example, even if it is a partial sequence or other amino acid sequence is added thereto, such proteins are also included in the G protein-coupled receptor protein of the invention, as long as they show the same activity of the G protein-coupled receptor protein represented by the amino acid sequence shown in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26. Also, as is known by the interferon gene and the like, it is considered that genes of eucaryote generally show polymorphism (e.g., see Nishi, T. et al. (1985), J. Biochem., 97, 153 - 159), and there is a case in which one or a plurality of amino acid are substituted by this polymorphism or a case in which the nucleotide sequence is changed but the amino acids are completely unchanged. In consequence, even in the case of proteins in which one or a plurality of amino acid residues are substituted, deleted or inserted at one or a plurality of positions in the amino acid sequence represented by Sequence No. 2, 4 or 6, it is possible that they have the same activity of the G protein-coupled receptor represented by the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4 or 6. These proteins are called equivalents to the G protein-coupled receptor protein of the invention and included in the invention. In addition, a G protein-coupled receptor having the rat origin amino acid sequence shown by Sequence No. 22, 24 or 26 or a G protein-coupled receptor having the same activity of the former receptor is also included in the equivalents.

[0037] All of the genes having nucleotide sequences which encode these equivalents to the G protein-coupled receptor protein of the invention are included in the invention. Such various genes of the invention can also be produced by nucleic acid chemical synthesis methods in accordance with a usual method such as the phosphite triester method (Hunkapiller, M. et al. (1984), Nature, 10, 105 - 111), based on the information on the G protein-coupled receptor protein of the invention described in the foregoing. In this connection, codons for desired amino acid are well known, and they can be optionally selected and determined in the usual way, for example by taking codon usage of the host to be used into consideration (Crantham, R. et al. (1981), Nucleic Acids Res., 9, r43 - r74). In addition, partial modification of codons of these nucleotide sequences can be carried out in the usual way in accordance, for example, with the site specific mutagenesis (Mark, D.F. et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 - 5666) which uses a primer comprised of a synthetic oligonucleotide coding for the desired modification.

[0038] Determination of the sequence of DNA obtained by the above methods a) to d) can be carried out by, for example, the Maxam-Gilbert chemical modification method (Maxam, A.M. and Gilbert, E. (1980): "Methods in Enzymology", 65, 499 - 559) or the dideoxy nucleotide chain termination method (Messing, J. and Vieira, J. (1982), *Gene*, 19, 269 - 276) which uses M13.

[0039] Also, the vector of the invention, the host cell of the invention and the G protein-coupled receptor protein of the invention can be obtained by the following methods. 2) Production method of recombinant protein of the G protein-coupled receptor of the invention

[0040] An isolated fragment containing a gene coding for the G protein-coupled receptor protein of the invention can transform other eucaryotic host cell by again integrating into an appropriate vector DNA. In addition, it is possible to express the gene in r spective host cells by introducing an appropriate promoter and a sequence related to the gene

expression into these vectors.

[0041] Cells of vertebrates, insects, yeast and the like are included in the eucaryotic host cells and, though not particularly limited, examples of commonly used vertebrate cells include COS cell which is a simian cell (Gluzman, Y. (1981), Cell, 23, 175 - 182), a dihydrofolate reductase deficient strain of Chinese hamster ovary cell (CHO) (Urlaub, G. and Chasin, L.A. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 - 4220), human fetal kidney HEK293 cell and 293-EBNA cell (Invitrogen) prepared by introducing Epstein Barr virus EBNA-1 gene into the human cell.

[0042] As the expression vector for vertebrate cells, a vector which contains a promoter positioned on the upstream of the gene to be expressed, an RNA splicing site, a polyadenylation site, transcription termination sequence and the like can generally be used, and it may further contain a replication origin as occasion demands. Examples of the expression vector include pSV2dhfr having SV40 early promoter (Subramani, S. et al. (1981), Mol. Cell. Biol., 1, 854-864), pEF-BOS having human elongation factor promoter (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990), Nucleic Acids Res., 18, 5322), pCEP4 having cytomegalovirus promoter (Invitrogen) and the like, though not limited thereto.

[0043] In a case in which COS cell is used as the host cell, an expression vector which has SV40 replication origin, can perform autonomous growth in COS cell and has a transcription promoter, a transcription termination signal and an RNA splicing site can be used, and its examples include pME18S (Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990), *Med. Immunol.*, 20, 27 - 32), pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322), pCDM8 (Seed, B. (1987), *Nature*, 329, 840 - 842) and the like. The expression vector can be incorporated into COS cell by, for example, the DEAE-dextran method (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983), *Nucleic Acids Res.*, 11, 1295 - 1308), the calcium phosphate-DNA co-precipitation method (Graham, F.L. and van der Ed., A.J. (1973), Virology, 52, 456 - 457), a method which uses FuGENE6 (Boeringer Mannheim) or the electroporation method (Neumann, E. *et al.* (1982), *EMBO J.*, 1, 841 - 845), and a desired transformant cell can thus be obtained.

[0044] Also, when CHO cell is used as the host cell, a transformant cell capable of stably producing the novel G protein-coupled receptor protein can be obtained by carrying out co-transfection of an expression vector together with a vector capable of expressing *neo* gene which functions as a G418 resistance marker, such as pRSVneo (Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY) or pSV2-neo (Southern, P.J. and Berg, p. (1982), J. Mol. Appl. Genet., 1, 327 - 341), and selecting a G418 resistant colony. In addition, when 293-EBNA cell is used as the host cell, a desired transformant cell can be obtained using an expression vector which has Epstein Barr virus replication origin and can perform autonomous growth in the 293-EBNA cell, such as pCEP4 (Invitrogen).

[0045] The thus obtained desired transformant can be cultured in the conventional way, and the G protein-coupled receptor protein of the invention is produced inside the cells or on the cell surface by this culturing. Regarding the medium to be used in this culturing, it can be optionally selected from various commonly used media depending on each host cell employed; for example, in the case of the COS cell, RPMI-1640 medium, Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) or the like can be used by adding serum components such as fetal bovine serum (FBS) and the like as occasion demands. Also, in the case of the 293-EBNA cell, Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) or the like medium supplemented with serum components such as fetal bovine serum (FBS) and the like can be used by further adding G418.

[0046] The G protein-coupled receptor protein of the invention thus produced inside the cell or on the cell surface of the transformant can be separated and purified therefrom by various known separation techniques making use of physical properties, chemical properties and the like of the receptor protein. Illustrative examples of such techniques, to be carried out after solubilization of the receptor protein-containing membrane fraction, include usual treatment with a protein precipitant, ultrafiltration, various liquid chromatography means such as molecular sieve chromatography (gel filtration), adsorption chromatography, ion exchange chromatography, affinity chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC) and the like, dialysis and combinations thereof. In this connection, the membrane fraction can be obtained in the usual way. For example, it can be obtained by culturing the cells which expressed the G protein-coupled receptor protein on the surface, suspending them in a buffer and then homogenizing and centrifuging them. Also, when the G protein-coupled receptor protein is solubilized using a solubilizing agent as mild as possible (CHAPS, Triton X-100, digitonin or the like), characteristics of the receptor can be maintained after the solubilization.

By effecting expression of the G protein-coupled receptor protein of the invention through its in-frame fusion with a marker sequence, confirmation of the expression the G protein-coupled receptor protein, confirmation of its intracellular localization, purification thereof and the like become possible. Examples of the marker sequence include FLAG epitope, Hexa-Histidine tag, Hemagglutinin tag, myc epitope and the like. Also, when a specific sequence recognizable by a protease such as enterokinase, factor Xa or thrombin is inserted between a marker sequence and the G protein-coupled receptor protein, the marker sequence can be cut and removed by such a protease. For example, there is a report in which muscarinic acetylcholine receptor and Hexa-Histidine tag are connected with a thrombin-recognizing sequence (Hayashi, M.K. and Haga, T. (1996), J. Biochem., 120, 1232 - 1238).

[0048] A method for the screening of compounds, peptides and antibodies capable of modifying activity of the G protein-coupled receptor protein is included in the invention. This screening method comprises adding an agent to be

tested to a system in which an index of the modification of G protein-coupled receptor protein in response to a physiological characteristic of the G protein-coupled receptor protein is measured making use of the thus constructed G protein-coupled receptor protein, and measuring the index. The following screening methods can be cited as illustrative examples of this measuring system. Also, examples of useful drugs to be tested include compounds or peptides which are conventionally known to have G protein-coupled receptor ligand activity but their ability to selectively modify activity of the novel G protein-coupled receptor protein is not clear, known compounds and peptides registered in chemical files but their various G protein-coupled receptor ligand activities are unknown, compounds obtained by the method such as combinatorial chemistry techniques (Terrett, N.K. et al. (1995), Tetrahedron, 51, 8135 - 8137) and random peptides prepared by employing a phage display (Felici, F. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222, 301 - 310) or the like. In addition, culture supernatants of microorganisms, natural components originated from plants and marine organisms, animal tissue extracts and the like are also objects of the screening. Also useful are compounds or peptides obtained by chemically or biologically modifying a compound or peptide selected by the screening method of the invention.

- 3) Screening methods of ligands of the G protein-coupled receptor protein of the invention, namely compounds, peptides and antibodies which modify activity of the G protein-coupled receptor protein of the invention
 - a) A screening method which uses a ligand binding assay method
 - [0049] Compounds, peptides and antibodies which bind to the G protein-coupled receptor protein of the invention (generally referred to as ligand) can be screened by a ligand binding assay method. A cell membrane sample obtained after expression of the receptor protein or a purified sample of the receptor protein is prepared, and a ligand purified for use in the ligand binding assay is radiation-labeled (50 to 2,000 Ci/mmol). Buffer solution, ions, pH and the like assay conditions are optimized, and the receptor protein-expressed cell membrane sample or the purified receptor protein sample is incubated in the thus optimized buffer for a predetermined period of time together with the radiation-labeled ligand. After the reaction, this is filtered through, e.g., a glass filter and washed with an appropriate amount of the buffer, and then the radioactivity remained on the filter (total binding amount) is measured using, e.g., a liquid scintillation counter. Nonspecific binding amount is measured by adding the unlabeled ligand in large excess in the reaction solution, and the specific binding amount is obtained by subtracting the nonspecific binding amount from the total binding amount. A ligand showing specific binding to the receptor protein-expressed cell membranes or the purified receptor protein can be selected as a ligand of the G protein-coupled receptor protein of the invention. In addition, a compound, peptide or antibody having agonist activity, or a compound, peptide or antibody having antagonist activity; of the G protein-coupled receptor protein can be screened making use of the binding inhibition of the thus obtained radioactive ligand as an index.
- b) A screening method which uses a GTPγS binding method
 - [0050] Compounds, peptides and antibodies capable of modifying the activity of the G protein-coupled receptor protein of the invention can be screened by a GTPγS binding method (Lazareno, S. and Birdsall, N.J.M. (1993), Br. J. Phaxmacol., 109, 1120 1127). Cell membranes obtained after expression of the receptor protein is mixed with 400 pM of GTPγS labeled with ³⁵S in a solution of 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and 50 mM GDP. After incubation in the presence or absence of an agent to be tested, this is filtered through, e.g., a glass filter and then radioactivity of the bound GTPγS is measured using, e.g., a liquid scintillation counter. A compound, peptide or antibody having agonist activity of the G protein-coupled receptor protein can be screened making use, as an index, of the increased specific GTPγS binding in the presence of the drug to be tested. Also, a compound, peptide or antibody having antagonist activity of the G protein-coupled receptor protein can be screened making use, as an index, of the suppression of increase in the GTPγS binding by the thus obtained compound, peptide or antibody having agonist activity.
- c) A screening method which uses changes in the intracellular Ca++ and cAMP concentrations
- [0051] Many G protein-coupled receptor proteins induce increase in Ca⁺⁺ and/or increase or decrease in cAMP concentration in the cells caused by an agonist stimulus. Accordingly, compounds, peptides and antibodies capable of modifying the activity of the G protein-coupled receptor protein of the invention can be screened making use of the changes in the intracellular Ca⁺⁺ or cAMP concentration. The Ca⁺⁺ concentration is measured using fura2 and the like, and the cAMP concentration is measured using a commercially available cAMP assay kit (by Amersham, etc.).
- [0052] Alternatively, it is possible to measure the Ca⁺⁺ and cAMP concentrations indirectly, by detecting the transcription activity of a gene whose transcription amount is controlled depending on the Ca⁺⁺ and cAMP concentrations. A sample such as a compound, a peptide, a tissue extract or the like is allowed to react for a predetermined period of time with cells in which the receptor protein is expressed or host cells in which the receptor protein is not expressed

(control cells), and the Ca⁺⁺ and cAMP concentrations are measured directly or indirectly. A compound, peptide or antibody having agonist activity can be screened making use, as an index, of the increase in Ca⁺⁺ and/or increase or decrease in cAMP concentration in the receptor protein-expressed cells by comparing with the control cells. Also, a compound, peptide or antibody having antagonist activity of the G protein-coupled receptor protein can be screened making use, as an index, of the increase in Ca⁺⁺ and/or increase or decrease in cAMP concentration caused by the thus obtained compound, peptide or antibody having agonist activity.

d) A screening method which uses Microphysiometer

[0053] Upon various signal responses of cells, trace amount of hydrogen ions outflow into the extracellular moiety is detected. Most of this outflow of hydrogen ions occur when metabolites formed by the fuel consumption of cells to obtain energy for their responses are increased or when signals of the cells are transmitted directly to the hydrogen ion pump. Since the G protein-coupled receptor protein of the invention requires energy for its signal transmission, outflow of hydrogen ions occurs when the receptor is activated. Since changes in pH caused by such a trace outflow of hydrogen ions in a medium around cells can be detected by CYTOSENSOR Microphysiometer (Molecular Devices), it can be used for the detection of the activation energy consuming receptors.

[0054] A compound, a peptide, a tissue extract or the like is allowed to react for a predetermined period of time with cells in which the receptor protein is expressed or host cells in which the receptor protein is not expressed (control cells), and changes in the pH due to outflow of hydrogen ions are measured. A compound, peptide or antibody having agonist activity can be screened making use, as an index, of the changes in pH caused by the outflow of hydrogen ions from the receptor protein-expressed cells by comparing with the control cells. Also, a compound, peptide or antibody having antagonist activity of the G protein-coupled receptor protein can be screened making use, as an index, of the changes in pH due to the outflow of hydrogen ions caused by the thus obtained compound, peptide or antibody having agonist activity.

25 [0055] A medicament which contains as the active ingredient a compound, peptide or antibody capable of significantly modifying the activity of the G protein-coupled receptor protein or a G protein-coupled receptor protein selected by the screening method is included in the invention.

[0056] The antibody, such as a polyclonal antibody or monoclonal antibody, which reacts with the G protein-coupled receptor protein of the invention can be obtained by directly administering the novel G protein-coupled receptor protein or a fragment of the G protein-coupled receptor protein to various animals. It can also be obtained by a DNA vaccine method (Raz, E. et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519 - 9523; Donnelly, J.J. et al. (1996), J. Infect. Dis., 173, 314 - 320) using a plasmid in which a gene which encodes the G protein-coupled receptor protein of the invention is introduced.

[0057] The polyclonal antibody is produced from sera or eggs of an animal (e.g., rabbit, rat, goat, fowl or the like) immunized and sensitized by emulsifying the G protein-coupled receptor protein or a fragment thereof in an appropriat adjuvant such as complete Freund's adjuvant and administering it by intraperitoneal, subcutaneous or intravenous injection. The polyclonal antibody thus produced from sera or eggs can be separated and purified by the usual protein isolation purification methods. Examples of such methods include centrifugation, dialysis, salting out with ammonium sulfate, and chromatographic techniques using carriers such as DEAE-cellulose, hydroxyapatite, protein A agarose and the like.

[0058] An active antibody fragment containing a part of the antibody, such as F(ab')2, Fab, Fab' or Fv, can be obtained by digesting the thus separated and purified antibody with a proteolytic enzyme such as pepsin, papain or the like in the usual way and subsequently separating and purifying it by the usual protein isolation purification methods.

[0059] It is possible for those skilled in the art to easily produce a monoclonal antibody by the cell fusion method of Kohler and Milstein (Kohler, G. and Milstein, C. (1975), *Nature*, 256, 495 - 497).

[0060] Mice are immunized by intraperitoneal, subcutaneous or intravenous inoculation of an emulsion prepared by emulsifying the G protein-coupled receptor protein of the invention or a fragment thereof in an appropriate adjuvant such as complete Freund's adjuvant, several times repeatedly at intervals of several weeks. After final immunization, spleen cells are collected and fused with myeloma cells to prepare a hybridoma.

[0061] Myeloma cells having hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency, thymidine kinase deficiency or the like marker, such as mouse myeloma cell strain P3X63Ag8.U1, are used as the myeloma cells for obtaining the hybridoma. Also, polyethylene glycol is used as the fusing agent. In addition, Eagle's minimum essential medium, Dulbecco's modified minimum essential medium, RPMI-1640 or the like generally used medium is optionally supplemented with 10 to 30% of fetal bovine serum and used as the medium for the preparation of the hybridoma. Fused strains are selected by the HAT selection method. Screening of hybridoma is carried out using a conventional method such as the culture supernatant by ELISA, immunohistological staining or the like or by the screening method described in the foregoing, and a hybridoma clone secreting the antibody of interest is selected. Also, monoclonal nature of the hybridoma is confirmed by repeating subcloning by means of limiting dilution analysis. When the thus

obtained hybridoma is cultured for 2 to 4 days in a medium or for 10 to 20 days in the abdominal cavity of a BALB/c mice pretreated with pristane, the antibody in an amount sufficient for purification is produced.

[0062] The thus produced monoclonal antibody can be separated and purified from the culture supernatant or ascites by the usual protein isolation purification methods. Examples of such methods include centrifugation, dialysis, salting out with ammonium sulfate, and chromatographic techniques using carriers such as DEAE-cellulose, hydroxyapatite, protein A agarose and the like. In addition, the monoclonal antibody or an antibody fragment containing a part thereof can also be produced by integrating entire portion or a part of a gene coding for the antibody into an expression vector and introducing into Escherichia coli, yeast or animal cells. An active antibody fragment containing a part of the antibody, such as F(ab')2, Fab, Fab' or Fv, can be obtained by digesting the thus separated and purified antibody with a proteolytic enzyme such as pepsin, papain or the like in the usual way and subsequently separating and purifying it by the usual protein isolation purification methods.

[0063] In addition, it is possible to obtain an antibody capable of reacting with the G protein-coupled receptor protein of the invention as single chain Fv or Fab by the method of Clackson *et al.* or Zebedee *et al.* (Clackson, T. *et al.* (1991), *Nature*, 352, 624 - 628; Zebedee, S. *et al.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3175 - 3179). It is also possible to obtain a human antibody by immunizing a transgenic mouse in which a mouse antibody gene is replaced by a human antibody gene (Lonberg, N. *et al.* (1994), *Nature*, 368, 856 - 859).

[0064] The medicament of the invention is characterized in that it has a novel pharmacological action to selectively control activity of the G protein-coupled receptor, and examples of the use of the medicament include central nervous system diseases which are induced by abnormalities of the G protein-coupled receptor activity (acceleration, reduction, denaturation and the like) or which express the abnormalities as complications.

[0065] The pharmaceutical preparation which contains a compound, peptide, antibody or antibody fragment capable of modifying activity of the G protein-coupled receptor protein of the invention, as the active ingredient, can be prepared using carriers, fillers and other additives generally used in the preparation of medicaments, in response to each type of the active ingredient.

[0066] Examples of its administration include oral administration in the form of tablets, pills, capsules, granules, fine granules, powders, oral solutions and the like, and parenteral administration in the form of intravenous, intramuscular and the like injections, suppositories, percutaneous preparations, transmucosal absorption preparations and the like. Particularly, in the case of peptides which are digested in the stomach, intravenous injection or the like parenteral administration is desirable.

[0067] In the solid composition for use in the oral administration according to the present invention, one or more active substances are mixed with at least one inert diluent such as lactose, mannitol, glucose, microcrystalline cellulose, hydroxypropylcellulose, starch, polyvinyl pyrrolidone or aluminum magnesium metasilicate. In the usual way, the composition may contain additives other than the inert diluent, for example, a lubricant, a disintegrating agent, a stabilizing agent and a solubilizing or solubilization assisting agent. If necessary, tablets or pills may be coated with a sugar coating or a film of a gastric or enteric substance.

[0068] The liquid composition for oral administration includes emulsions, solutions, suspensions, syrups and elixirs and contains a generally used inert diluent such as purified water or ethanol. In addition to the inert diluent, this composition may also contain other additives such as moistening agents, suspending agents, sweeteners, flavors and antiseptics.

[0069] The injections for parenteral administration includes aseptic aqueous or non-aqueous solutions, suspensions and emulsions. Examples of the diluent for use in the aqueous solutions and suspensions include distilled water for injection use and physiological saline. Examples of the diluent for use in the non-aqueous solutions and suspensions include propylene glycol, polyethylene glycol, plant oils (e.g., olive oil), alcohols (e.g., ethanol), polysorbate 80 and the like. Such a composition may further contain a moistening agent, an emulsifying agent, a dispersing agent, a stabilizing agent, a solubilization assisting agent, an antiseptic and the like. These compositions are sterilized for example by filtration through a bacteria retaining filter, blending of a germicide or irradiation. Alternatively, they may be used by firstly making into sterile solid compositions and dissolving them in sterile water or other sterile solvent for injection use prior to their use.

[0070] The dose is optionally decided by taking into consideration strength of each active ingredient selected by the screening method described in the foregoing and symptoms, age, sex and the like of each patient to be administered.

Brief Description of the Drawings

[0071]

. . . .

Fig. 1 shows alignment of amino acid sequences of SREB1, SREB2 and SREB3.

Fig. 2 shows a result of Northern analysis of SREB1 in human organs.

Fig. 3 shows a result of Northern analysis of SREB1 in each region of human brain.

- Fig. 4 shows a result of Northern analysis of SREB2 in human organs.
- Fig. 5 shows a result of Northern analysis of SREB2 in each region of human brain.
- Fig. 6 shows a result of Northern analysis of SREB3 in human organs.
- Fig. 7 shows a result of Northern analysis of SREB3 in each region of human brain.
- Fig. 8 shows a result confirming expression of SREB1, SREB2 or SBEB3 protein.
- Fig. 9 shows binding activity of anti-3LO antibody for SREB1, SREB2 or SREB3.
- Fig. 10 shows binding activity of anti-C24 antibody for SREB1.
- Fig. 11 shows pCRE-Luc derived luciferase activity in cells in which SREB1, SREB2 or SREB3 was introduced.
- Fig. 12 shows pSRE-Luc derived luciferase activity in cells in which SREB1, SREB2 or SREB3 was introduced.

Best Mode for Carrying Out the Invention

[0072] In order to disclose the invention further illustratively, Examples are described in the following, but the invention is not limited to these Examples. In this connection, unless otherwise noted, they can be carried out in accordance with known methods (Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY).

(Example 1) Isolation of genes coding for the novel G protein-coupled receptor family proteins

[0073] Full length cDNA coding for the G protein-coupled receptor family protein (SREB1, SREB2 or SREB3) of the invention was obtained by RT-PCR using human brain origin poly A⁺ RNA (Clontech) as the template.

[0074] In the amplification of the novel G protein-coupled receptor human SREB1, 5'-AAAATCTAGA CGCGAT-GGCGAACGCGAGCGA-3' (Sequence No. 7) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA GTCTATGT-GGCGGGGCCTCCC-3' (Sequence No. 8) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus). RT-PCR was carried out using Pfu DNA polymerase (Stratagene) and by repeating a cycle of 98°C (20 seconds)/64°C (30 seconds)/74°C (3 minutes) 34 times in the presence of 5% formamide. As the result, a DNA fragment of about 1.2 kbp was amplified. This fragment was digested with Xbal and then cloned using pCEP4 plasmid (Invitrogen). Since the pCEP4 plasmid contains CMV promoter which shows strong promoter activity in animal cells, it can be used in expressing recombinant proteins in animal cells. Nucleotide sequence of the thus obtained clone was analyzed by the dideoxy terminator method using ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 1 of the Sequence Listing.

[0075] This sequence contains an open reading frame of 1,125 bases (from the 1st position to the 1125th position of Sequence No. 1). An amino acid sequence (375 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 2 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence contains seven hydrophobic regions considered to be the transmembrane domains which is a characteristic of the G protein-coupled receptor, it was found that this gene encodes the G protein-coupled receptor.

[0076] In the amplification of the novel G protein-coupled receptor human SREB2, 5' -AAAATCTAGA TCTAT-GGCGAACTATAGCCATGCA-3' (Sequence No. 9) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA AAG-GCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3' (Sequence No. 10) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus) RT-PCR was carried out using Pfu DNA polymerase (Stratagene) and by repeating a cycle of 96°C (20 seconds) /54°C (30 seconds)/74°C (3 minutes) 34 times. As the result, a DNA fragment of about 1.2 kbp was amplified. This fragment was digested with Xbal and then cloned using pCEP4 plasmid (Invitrogen). Nucleotide sequence of the thus obtained clone was analyzed by the dideoxy terminator method using ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 3 of the Sequence Listing.

[0077] This sequence contains an open reading frame of 1,110 bases (from the 1st position to the 11,0th position of Sequence No. 3). An amino acid sequence (370 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 4 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence contains seven hydrophobic regions considered to be the transmembrane domains which is a characteristic of the G protein-coupled receptor, it was found that this gene encodes the G protein-coupled receptor.

[0078] In the amplification of the novel G protein-coupled receptor human SREB3, 5'-AAAATCTAGA GTAT-GGCCAACACTACCGGAGAG-3' (Sequence No. 11) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA CCTGTCT-GCCTACCAGCCTGC-3' (Sequence No. 12) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus). RT-PCR was carried out using Pfu DNA polymerase (Stratagene) and by repeating a cycle of 98°C (20 seconds)/62°C (30 seconds)/74°C (3 minutes) 34 times in the presence of 5% formamide. As the result, a DNA fragment of about 1.2 kbp was amplified. This fragment was digested with Xbal and then cloned using pCEP4 plasmid (Invitrogen). Nucleotide sequence of the thus obtained clone was analyzed by the dideoxy terminator method using ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 5 of the Sequence Listing.

[0079] This sequence contains an open reading frame of 1,119 bases (from the 1st position to the 1119th position

of Sequence No. 5). An amino acid sequence (373 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 6 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence contains seven hydrophobic regions considered to be the transmembrane domains which is a characteristic of the G protein-coupled receptor, it was found that this gene encodes the G protein-coupled receptor.

[0080] Homology of the novel G protein-coupled receptor SREB family (SREB1, SREB2 or SREB3) with a known G protein-coupled receptor family is 25% or less, respectively.

[0081] On the other hand, homology of SREB1 with SREB2 is 52%, homology of SREB1 with SREB3 is 52% and homology of SREB2 with SREB3 is 63%, which are significantly higher than the homology with known G protein-coupled receptors (Fig. 1). This fact shows that the G protein-coupled receptors SREB1, SREB2 and SREB3 of the invention form a novel G protein-coupled receptor family independent of the known G protein-coupled receptors.

(Example 2) Expression distribution of human novel G protein-coupled receptor family genes in tissues

Expression distribution of the G protein-coupled receptor genes of the invention was analyzed by the north-[0082] ern blot hybridization method. A cDNA fragment (from the 722nd position to the 1054th position in Sequence No. 1) was used as the probe of human SREB1. Poly A⁺ RNA (2 μg) originated from each of human organs was blotted on a membrane (Clontech), and its hybridization with the probe was carried out at 42°C (18 hours) in a solution containing 50% formamide, 5 x SSPE, 10 x Denhardt's solution, 2% SDS and 100 μ g/ml denatured salmon sperm DNA. The membrane was finally washed twice (65°C for 30 minutes) with a solution containing 02 x SSC and 0.1% SDS. As shown in Fig. 2, when the northern analysis was carried out on each of human organs (heart, brain, placenta, lung, liver, skeletal muscle, kidney, pancreas, spleen, thymus, prostate, testis, ovary, small intestine, large intestine and peripheral leukocyte), 3 kb of mRNA was detected in the brain, ovary, testis, heart and prostate, and 3 kb and 2.3 kb mRNA in the peripheral leukocyte. Also, a signal of 3 kb was slightly detected in the pancreas, too. In addition, the northern analysis was also carried out on each of the regions of the human brain (amygdala, caudate nucleus, corpus callosum, hippocampus, substania nigra, subthalamic nucleus, thalamus, cerebellum, cerebral cortex, medulla, spinal cord, occipital lobe, frontal lobe, temporal lobe and putamen). Since the 3 kb mRNA of the C protein-coupled receptor human SREB1 gene of the invention was detected in all of the examined human brain regions, it was found that it is expressed broadly in the human brain (Fig. 3).

[0083] A cDNA fragment (from the 558th position to the 888th position in Sequence No. 3) was used as the probe of human SREB2. When the northern analysis was carried out under the same conditions, 3.2 kb mRNA was detected in the brain, and 2.4 kb, 3.5 kb and 6.3 kb mRNA in the testis, as shown in Fig. 4. Also, the signal of 3.5 kb was detected in the placenta and spleen, and the signal of 3.2 kb in small intestine, all slightly. Among regions in the brain, the 3.2 kb mRNA of the G protein-coupled receptor human SREB2 gene of the invention was abundantly detected in the amy-gdala, caudate nucleus, hippocampus, substania nigra, subthalamic nucleus, thalamus, cerebellum, cerebral cortexes and putamen, but not so much in the corpus callosum, medulla and spinal cord. In addition, a signal of 7.8 kb was slightly detected in each of the grain regions (Fig. 5)

[0084] A cDNA fragment (from the 1st position to the 652nd position in Sequence No. 5) was used as the probe of human SREB3. When the northern analysis was carried out under the same conditions, 4 kb and 5.1 kb mRNA was detected in the brain, and 4 kb, 5.1 kb and 9.7 kb mRNA in the ovary, as shown in Fig. 6. The G protein-coupled receptor human SREB3 gene of the invention was detected in each region of the brain as signals of mainly 4 kb, 5.1 kb and cerebral cortex, and the 4 kb mRNA was detected in the amygdala, hippocampus, subthalamic nucleus, cerebellum and cerebral cortex, and the 5.1 kb mRNA in the substania nigra, subthalamic nucleus and spinal cord, relatively abundantly (Fig. 7).

[0085] The above results showed that the G protein-coupled receptor family genes SREB1, SREB2 and SREB3 of the invention are expressed mainly in the central nervous system and urinary organ/reproductive organ system.

(Example 3) Confirmation of the expression of the novel human G protein-coupled receptor family proteins

[0086] pCEP4 (Invitrogen) was used as the expression vector for expressing human SREB1, SREB2 or SREB3. In this case, in order to fuse a FLAG epitope as a marker sequence with the N terminus of human SREB1, SREB2 or SREB3, ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGGATCCTG (Sequence No. 13) was inserted into the 5' terminus of the protein coding sequence of SREB1, SREB2 or SREB3. The thus constructed plasmids were named pCEP4-FL-SREB1, pCEP4-FL-SREB2 and pCEP4-FL-SREB3, respectively. By the use of these plasmids, a polypeptide in which a sequence Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ile Leu (Sequence No. 14) is fused with the N terminus of the polypeptide of SREB1, SREB2 or SREB3 is expressed.

[0087] A 1 x 10⁶ cells portion of 293-EBNA (Invitrogen) was inoculated into a 10 cm Petri dish and cultured for 1 day, and then gene transfer of 8 µg of pCEP4-FL-SREB1, pCEP4-FL-SREB2, pCEP4-FL-SREB3 or pCEP4-FL (vector alone) was carried out using FuGENE6 (Boeringer Mannheim). After the gene transfer, the cells were cultured for 1 day,

harvested, washed, suspended in 20 mM of Tris-HCI (pH 7.4)/150 mM NaCI/Complete™ (Boeringer Mannheim) and then homogenized using Polytron. The homogenate was mixed with Triton X-100, Digitonin and sodium cholate to final concentrations of 0.2%, 0.1% and 0.2% and then solubilized by incubating at 4°C for 2 hours. Immunoprecipitation of the FLAG epitope fusion protein from the thus solubilized sample was effected using M2-agarose (Sigma). The immune precipitate was eluted with 200 µM FLAG peptide/20 mM Tris-HCI (pH 7.4)/150 mM NaCI. The eluted sample was concentrated, subjected to electrophoresis using SDS/10%-20% acrylamide gel (Daiichi Pure Chemicals) and then transferred on a PVDF membrane using a blotting apparatus. The PVDF membrane after the transfer was subjected to blocking and then allowed to react with a mouse anti-FLAG monoclonal antibody (M2; Sigma) and a horseradish peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG polyclonal antibody (Zymed) in that order. After the reaction, expression of SREB1, SREB2 or SREB3 protein was confirmed using ECL Western Blotting Detection System (Amersham-Pharmacia) (Fig. 8).

[0088] The protein capable of reacting with the anti-FLAG antibody was not present in the cells in which pCEP4-FL was introduced but detected in the cells in which pCEP4-FL-SREB1, pCEP4-FL-SREB2 or pCEP4-FL-SREB3 was introduced as a band of 35 to 45 kDa. Estimated molecular weights of human SREB1, human SREB2 and human SREB3 were 39.8 kDa, 42.0 kDa and 41.5 kDa, respectively, and their bands were found at positions of almost expected molecular weights. In addition, a band of 65 to 75 kDa considered to be a dimer was detected in the case of human SREB1.

(Example 4) Isolation of gene coding for rat SREB1 (rSREB1), rat SREB2 (rSREB2) or rat SREB3 (rSREB3) protein

[0089] Complete length cDNA coding for rSREB2, rSREB2 or rSREB3 was obtained by RT-PCR using rat brain origin poly A⁺ RNA (Clontech) as the template.

[0090] In the amplification of rSREB1, 5'-AAAATCTAGACGCGATGGCGAACGCTAGTGA-3' (Sequence No. 15) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA CACTTTGAGAGTCTTGTGAAGGC-3' (Sequence No. 16) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus). Amplification, cloning and nucleotide sequence determination of cDNA were carried out by the same methods of Example 1. The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 21 of the Sequence Listing.

[0091] This sequence contains an open reading frame of 1,131 bases (from the 1st position to the 1131st position of Sequence No. 21). An amino acid sequence (377 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 22 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence coincided in 97% frequency with the human SREB1, it was found that this gene encodes rSREB1.

[0092] In the amplification of rSREB2, 5'-AAAATCTAGATCTATGGCGAACTATAGCCATGC-3' (Sequence No. 17) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA AAGGCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3' (Sequence No. 18) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus) Amplification, cloning and nucleotide sequence determination of cDNA were carried out by the same methods of Example 1. The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 23 of the Sequence Listing.

[0093] This sequence contains an open reading frame of 1,110 bases (from the 1st position to the 1110th position of Sequence No. 23). An amino acid sequence (370 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 24 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence coincided in 100% frequency with the human SREB2, it was found that this gene encodes rSREB2.

[0094] In the amplification of rSREB3, 5'-AAAATCTAGACAAATACTGAACTGGCCGATCCCC-3' (Sequence No. 19) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA TGTTGGCCCCAGTATGGTGATCAT-3' (Sequence No. 20) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus). Amplification, cloning and nucleotide sequence determination of cDNA were carried out by the same methods of Example 1. The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 25 of the Sequence Listing.

[0095] This sequence contains an open reading frame of 1,119 bases (from the 1st position to the 1119th position of Sequence No. 25). An amino acid sequence (373 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 26 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence coincided in 99% frequency with the human SREB3, it was found that this gene encodes rSREB3.

(Example 5) Preparation of antibody for human SREB1

[0096] A partial amino acid sequence of human SREB1 was fused with glutathione-S-transferase (GST) and used as the immunization antigen for the preparation of antibody for human SREB1. Illustratively, a cDNA fragment corresponding to a region of from the 208th position to the 282nd position (3LO) and a region of from the 351st position to the 375th position (C24) of the human SREB1 amino acid sequence (Sequence No. 2) was amplified by PCR in an way to bind cleavage sites of restriction nzymes BamHI and XhoI, and inserted between BamHI and XhoI sites of GST Gene Fusion Vector (pGEX-5X-1: Amersham-Pharmacia). Competent cells of an Escherichia coli strain

20

20

35 tio

40

45

.

BL21(DE3)pLysS (Novagen) were transformed with the thus constructed plasmid. By culturing the transformant and inducing expression of the gene with 1 mM IPTG, a GST-3LO fusion protein and a GST-C24 fusion protein were expressed in the *E. coli* cells. The GST-3LO and GST-C24 were purified from disrupted *E. coli* cells using Glutathione Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia) in accordance with the instruction attached thereto.

[0097] The thus purified GST-3LO fusion protein was mixed with the same amount of Freund's complete adjuvant (CalBioChem) and emulsified, and the emulsion was administered to a female white Leghorn (140 days of age) at around the bursa of Fabricius. The initial dose was 1 mg, and it was administered thereafter in 0.5 mg portions 4 times at intervals of 2 weeks. After the final immunization, eggs were collected, the yolk of eggs was diluted with physiological saline and defatted using dextran sulfate, and then IgY was purified using DEAE Sepharose (Amersham-Pharmacia) to obtain anti-3LO antibody. Also, the purified GST-C24 fusion protein was mixed with the same amount of TiterMax Gold (CytRX) and emulsified, and the emulsion was administered under the dorsal skin of a Japanese white rabbit (6 weeks of age). Its initial dose was 1 mg, and it was administered thereafter in 0.5 mg portions 2 times at intervals of 2 weeks. After the final immunization, blood was collected, and IgG was purified from the serum using Protein G Sepharose (Amersham-Pharmacia) in accordance with the instruction attached thereto, thereby obtaining anti-C24 antibody.

[0098] Since the anti-3LO antibody uses a region of from the 208th position to the 282nd position of the human SREB1 amino acid sequence (Sequence No. 2) as the antigen and this partial amino acid sequence contains a large number of sequences common to SREB1, SREB2 and SREB3 (cf. Fig. 1), there is a possibility that the anti-3LO anti-body commonly recognizes SREB1, SREB2 and SREB3. Also, since the anti-C24 antibody uses a region of from the 351st position to the 375th position of the human SREB1 amino acid sequence (Sequence No. 2) as the antigen and this partial amino acid sequence is a sequence in which SPEB2 and 3 are not present but SREB1 alone is present (cf. Fig. 1), there is a possibility that the anti-C24 antibody recognizes only SREB1. In consequence, in order to confirm the specificity of anti-3LO antibody and anti-C24 antibody, Western blotting was carried out using the immune precipitate of anti-FLAG antibody of 293-EBNA in which SREB1, SREB2 or SREB3 was expressed, prepared in Example 3, and the anti-3LO antibody and anti-C24 antibody.

[0099] Illustratively, each sample was subjected to electrophoresis using SDS/10%-20% acrylamide gel (Daiichi Pure Chemicals) and then transferred on a PVDF membrane using a blotting apparatus. The PVDF membrane after the transfer was subjected to blocking and then allowed to react with 10 μg/ml of the anti-3LO antibody and a horseradish peroxidase-labeled rabbit anti-chicken IgG polyclonal antibody (Zymed) in that order or with 10 μg/ml of the anti-C24 antibody and a horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG polyclonal antibody (MBL) in that order. After the reaction, color development was carried out using ECL Western Blotting Detection System (Amersham-Pharmacia). A band reacting with the anti-3LO antibody was detected at the same position of the anti-FLAG antibody of Example 3 in cells in which pCEP4-FL-SREB1, pCEP4-FL-SREB2 or pCEP4-FL-SREB3 (Fig. 9) was introduced. Also, a band reacting with the anti-C24 antibody was detected at the same position of the anti-FLAG antibody of Example 3 only in the cells in which pCEP4-FL-SREB1 was introduced (Fig. 10).

Based on the above results, it was confirmed that the anti-3LO antibody is an antibody which recognizes SREB1, SREB2 or SREB3, and the anti-C24 antibody is an antibody which recognizes only SREB1. The use of these antibodies has rendered possible the detection of natural SREB1, SREB2 or SREB3 by the method such as the Western blotting, immunohistological staining or the like.

(Example 6) Evaluation of transcription activity via cAMP-response element (CRE) or serum response element (SRE) in human SREB1-, SREB2- or SREB3-introduced cells

[0101] Increase in the transcription activity mediated by CRE or SRE is induced by the activation of the intracellular information transmission system of various G protein-coupled receptors (Lolait, S.J. et al. (1992), Nature, 357, 336-339; Hoeltzel, W.L. et al. (1997), Am. J. Physiol., 273, C2037 - C2045; An, S. et al. (1998), J. Biol. Chem., 273, 7906-7910). Also, it is known that the intracellular information transmission system of G protein-coupled receptors is partially activated via a certain transitional active conformation even in the absence of agonist (Kenakin, T. (1995), Trens. Pharmacol. Sci., 16, 188 - 192). Accordingly, if changes in the CRE- or SRE-mediated transcription activity in SREB1-, SREB2- or SREB3-introduced cells are found even in the absence of agonist, it can be confirmed that the G protein-coupled receptor is functional and that activation of the G protein-coupled receptor intracellular information transmission system leads to the CRE- and SRE-mediated transcription activity.

[0102] Using pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322) as the expression vector for expressing human SREB1, SREB2 or SREB3, pEF-BOS-SREB1, pEF-BOS-SREB2 and pEF-BOS-SREB3 were prepared. A 8 × 10⁴ cells portion of 293-EBNA (Invitrogen) was inoculated into a 24-well plate and cultured for 1 day, and then gene transfer of 250 ng of pEF-BOS-SREB1, pEF-BOS-SREB2, pEF-BOS-SREB3 or pEF-BOS (vector alone) was carried out together with 25 ng of a CRE-reporter plasmid pCRE-Luc (Stratagene) or an SRE-reporter plasmid pSRE-Luc (Stratagene), using FuGENE6 (Boeringer Mannheim) (3 wells for each). After the gene transfer, the cells were lysed at every 12 hours using PicaGene Cell Culture Lysis Reagent Luc (Nippon Gene), and the activity of luci-

ferase produced from each reporter plasmid was measured using PicaGene Luminescence Kit (Nippon Gene).

[0103] The luciferase activity in the SREB1-, SREB2- or SREB3-introduced cells after 24 hours of the gene transfer was treated as a relative activity to the luciferase activity of the vector alone introduced cells (control) (the control was defined as 1), with the results shown in Fig. 11 (pCRE-Luc derived luciferase activity) and Fig. 12 (pSRE-Luc derived luciferase activity). The CRE-mediated transcription activity increased most sharply in the SREB1-introduced cells and also increased significantly in the SREB2- and SREB3-introduced cells in comparison with the control. On the other hand, the SRE-mediated transcription activity increased most sharply in the SREB2-introduced cells and also increased significantly in the SREB1- and SREB3-introduced cells in comparison with the control.

[0104] It was revealed by these results that the SREB1, SREB2 and SREB3 are functional receptors, and activation of the intracellular information transmission system of these G protein-coupled receptors leads to the increase in the CRE- or SRE-mediated transcription activity.

Industrial Applicability

[0105] Novel G protein-coupled receptor family proteins SREB1, SREB2 and SREB3 expressing in the central nervous system, genes coding for these proteins, vectors containing these genes, host cells containing these vectors and methods for producing these G protein-coupled receptor proteins were provided by the present invention.

[0106] Also, it rendered possible to screen new medicaments, particularly new therapeutic agents for central nervous system diseases, through the screening of compounds, peptides and antibodies capable of modifying activities of the G protein-coupled receptor proteins of the invention by allowing the G protein-coupled receptors to contact with drugs to be tested.

Regarding the medicament of the invention which contains, as the active ingredient, a compound, peptide or antibody capable of specifically modifying activity of the G protein-coupled receptor proteins expressing in the central nervous system, its usefulness as therapeutic agents and the like for functional/organic diseases of the central nervous system. Also, since the G protein-coupled receptor family proteins of the invention are expressed not only in the central nervous system but also in the urinary organ/reproductive organ system, usefulness as therapeutic drugs and the like for diseases related to the urinary organ/reproductive organ system can be expected from the medicament which contains, as the active ingredient, a compound, peptide or antibody capable of specifically modifying their activities. In addition, since a member of the G protein-coupled receptors of the invention, such as SREB1 protein, is expressed not only in the central nervous system and urinary organ/reproductive organ system but also in the heart and peripheral leukocytes, a medicament which contains, as the active ingredient, a compound, peptide or antibody capable of specifically modifying the activity of SREB1 protein can be expected for its usefulness as therapeutic drugs and the like for circulatory system diseases and immune inflammation system diseases, in addition to central diseases and diseases related to the urinary organ/reproductive organ system.

[0108] The novel G protein-coupled receptor family SREB1, SREB2 or SREB3 of the invention has markedly high conservation ratio of amino acids in human and rat. This conservation ratio is most highest among the existing G protein-coupled receptor families, which seems to show that the novel G protein-coupled receptor family of SREB1, SREB2 and SREB3 is taking important roles in the living body, particularly a physiological role in the central nervous system. Also, since their amino acid sequences have a conversation ratio of 97% or more in human and rat, it is considered that almost no interspecies differences are present regarding activities of drugs which act upon the novel G protein-coupl d receptor family SREB1, SREB2 or SREB3. In consequence, when the G protein-coupled receptor protein of the invention itself or a compound or protein obtained by a screening using the receptor is developed as a medicament, the receptor has an advantage in that animal experiments using rats, for example, can be carried out in advance, prior to testing pharmacological effects on human, and is useful in terms that clinical data on human can be easily predicted from the animal experiment data.

[0109] Since expression of the G protein-coupled receptor proteins of the invention in organs and changes thereof can be detected by the method such as ELISA, radioimmunoassay, the Western blotting and the like using the antibodies, these antibodies for the novel G-protein coupled receptor proteins are useful as diagnostic agents. In addition, the antibodies capable of modifying activities of the novel G protein-coupled receptor proteins are useful as therapeutic drugs for diseases in which the novel G protein-coupled receptor proteins are involved and also as tools for the separation and purification of the receptor proteins.

SEQUENCE LIST

		<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.	
5		<120> A novel G protein coupled receptor protein	
. ,	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *	<130> Y9905-PCT	
10		<150> JP P1998-060245 <151> 1998-03-12	* / : :
		<150> JP P1999-026774 <151> 1999-02-03	
15		<160> 26	
		<170> Patentin Ver. 2.0	
20		<pre><210> 1 <211> 1128 <212> DNA <213> Homo sapiens</pre>	
25		<220> <221> CDS <222> (1) (1125)	
· · ·		⟨223⟩ SREB1	
•		(400) 1 atg ecg aac gcg agc gag ccg ggt ggc agc ggc ggc ggc ggg gcg agc 48 Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ala Ala	
<i>30</i> ·		1 S 10 15	
		gcc ctg ggc ctc aag ctg gcc acg ctc agc ctg ctg ctg tgc gtg agc 96 Ala Leu Gly Leu Lys Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Cys Val Ser 20 25 30	
35		cta gcg ggc aac gtg ctg ttc gcg ctg ctg atc gtg cgg gag cgc agc 144 Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu lle Val Arg Glu Arg Ser 35 40 45	
40		ctg cac cgc gcc ccg tac tac ctg ctg ctc gac ctg tgc ctg gcc gac 192 Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp 50 55 60	_
45		ggg ctg cgc gcg ctc gcc tgc ctc ccg gcc gtc atg ctg gcg gcg cgg 240 Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Het Leu Ala Ala Arg 65 70 75 80	
÷		cgt gcg gcg gcc gcg ggg ggg gcg ccg cgg ggc gcg ctg ggc tgc aag 288 Arg Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys 85 90 95	
50	0	ctg ctc gcc ttc ctg gcc gcg ctc ttc tgc ttc cac gcc gcc ttc ctg 336 Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu 100 105 110	
	and the second second		

5				Val					Tyr					His		cgc	384
			.Ala					Gly					Ala			gtg Val	432
10		Ala					Ala					Phe	ccg Pro			ctg Leu 160	480
15						Asp							ctg Leu			Arg	528
													ctg Leu				576
20													ctc Leu 205	Phe		atc He	524
25	cac His	gac Asp 210	cgc Arg	cgc Årg	aag Lys	atg Met	cgg Arg 215	ccc Pro	gcg Ala	cgc Arg	ctg Leu	gtg Val 220	ccc Pro	gcç Ala	gtc Val	agc Ser	572
<i>30</i>	cac His 225	qzA	tgg Trp	acc Thr	t tc Phe	cac His 230	gg¢ Gly	ccg Pro	ggc Gly	gcc	acc Thr 235	ggc Gly	cag	gcg Ala	gcc Ala	gcc Ala 240	720
	aac Asn												ccc Pro	Ala			768
35													cgc Arg				815
40	ctg Leu	Glu					Glu					Lys					864 -
45	gtc					Leu											912
	tac Tyr 305				Leu					Ala					Tyr		960
50	acg Thr			Val					Ala					Aśn		Yai	1008
		*												* .			

	g t Va	g te	c ti	e Le	ת אים	c aa e As	c ag n Ar	g ga g Gl	g ct u Le	g ag u Ar	g ga g As	c tg p Cy	c tt	c ag	g gc g Al	c cag a Glr	1056
5	t t Ph	c co e Pr	c tg o Cy 35	s Cy	c ca	g ag n Se	c cc r Pr	c cg o Ar	g Th	c ac	c ca r Gl	n Al	g ac a Th 36	r Hi	t cci s Pri	c tgc	1104
10	ga As	c ct p Le 37	g aa u Ly	2 gg	c all	eg Gl	t tt y Le 37	a tg									1128
15	<2 <2	10> 11> 12>	375 PRT			***											
20	< 40	10> 1			7	Git	r Pro	Gly	Gly	Ser 10	Gly	Gly	Gly	Glu	Ala 15	Ala	
25				20					25	*				30			
30			35 Arg		Val Pro	, , di		40 Leu					45				
	65				Leu	70		1	•		75	• • • • •				80	
35	i				Ala 85 Leu					90	-1				95		
40			115	Val	Gly			120	Tyr			,	125				
45	Cys	130			Arg		135	. (:	140			*:) =		
<i>50</i>	145 Asp	Gly	Gly	Gly	Asp 165	150 Asp			Ala		ISS Cys	Ala	Leu			160 Arg	
* * .	Pro	Asp	Gly	Ala 180	Pro	Gly	Ala		Gly 185	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu 190	Ala	Val	

															•				
			Val	l Val			2 Th	r Hi:	s Lei			r Lei	1 Arg	Lei	Leu	Phe	Phe	He	
					19	5				200					205		***		
_																			
5			His			g Arg	Ly	Ne Ne	t Arg	Pro	Ala	i Arg	Leu	Va 1	Pro	Ala	Va I	Ser	
8.				210)				215	i			-	220					
·-							٠		•				•						
		•			Trp	Thr	Phe	His	Gly	Pro	Gly	Alz	Thr	Gly	Gin	Ala	Ala	Ala	
			225	i				230)			•	235					240	
10												•							
			Asn	Trp	Thr	Ala			Gly	Arg	Gly	Pro	Thr	Pro	Pro	Ala	Fen	Val	
							245					250					255		
. •																		٠	
			Gly	He	Arg			G1 y	Pro	Gly			Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Va l	
15				, 1		260				• •	265					270		٠.	
													_		121	·. *	• •	1	
+			Leu	Giu			Lys	Thr	Glu		Arg	Leu	Cys	Ļys		Phe	Tyr	Ala:	
· ·					275					280			-	•	285		-7		
								,			_			_				•	
		•	Val			Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Trp	Gly	Pro		٧a١	Yal	Ala	Ser	
80				290					295					300					
1.1			T				•			D	Á1		i				· _		
· · · · · · · ·				Leu	Arg	Val	Leu			LLO	GIY	YIS		Pro	Gin	Ala	Tyr		
•			305					310				•	315					320	•
			Th.	41.	c	V-1	T		The	DL -	414	.012	A I'a	Clas	4.	4			
25			int	VIE	261	4 S 1		ren	tūr	FRE,	AIA.		MIZ	GIY	116	¥21	Pro	YEI	•
•.				-			325		•		•	330					335		
			Val	Ċu.	Dh.a		Dh.	i		٠		· A	Å	C	Dh.	A	Ala	C1 - 1	
			141	633	THE	340	LIIE	V211	איא	914	345	VIE	vah	C3.2	riie	350	VIT	612	,
					** •	340	. :	+.			343					230			
30			Phe	Pro	Cvs	Cve	Gin	Ser	Pro	Aro	The	The	Gin	Δia	Thr	Hie	Pro	Cve	
					355	٠,٠	·	VVI,		360		••••	•••	.,, .	365	1114		0).	
					•••							. '							•
	• .		Asp	Leu	Lvs	Glv	He	GIV	Leu				*	٠.٠	•				
				370	-,-				375			•							
					-				7	. * -									
15			:		,														
			<210	3															
			(211	> 11	13		•								,				
			(212	> DN	ia 🗀						- :		:-		,	. •.	•	, .	
		•	<213	> Ho	mo :	apie	ns												
ω .										·			· .	·	•				
			<220			•												•	
			<221										·			1			
			<222			(1110)												٠.
•			<223	> SR	EB2			. "				•							
5					,														
	•		<400	> 3							•								
			atg	gcg	aac	tat	agc.	cat	gca	gct	gac	aac	att	ttg	caa	aat	ctc	tcg	48
			Ket																
•			1			-	5				. '	10					15	•	
* **																•			
<i>o</i> .		•	cct	cta	aca	gcc	ttt	ctg	aaa	ctg	act	tcc	ttg	ggt	ttc	ata	ata	gga	96
			Pro																
					٠ .	20	,		-	•	25			-		30		•	•
				٠. ,		-													

	gic ag Val Se	c gtg i r Val V 35	gtg gg /al Gi	y Asn	ctc d Leu L	tg at eu 11 40	c too al e Ser II	t ttg e Leu	cta gtg Leu Val	aaa gat Lys Asp	144
	aag ac Lys Thi		at ag lis Ar	a gca g Ala	cct t Pro T 55	ac tad yr Tyl	ttc ct Phe Le	g ttg ; u Leu / 60	gat ctt Isp Leu (igc tgt Cys Cys	192
10	tca gat Ser Asp 65	atc c	tc ag eu Arı	a tot 3 Ser 70	eca a Ala i	tt tgt le Cys	tte cc Phe Pri	a ttt g Phe V	tg ttc a al Phe A	ac tet sn Ser 80	240
15	gtc aaa Val Lys	aat gg Asn G	gc tct ly Ser 85	HIII.	igg ac	t tat or Tyr	ggg aci Gly Thr 90	ctg a Leu T	ct tgc a hr Cys L	aa gtg ys Val	288
20	att gcc lle Ala	ttt ct Phe Le 10		gtt Val (ig ic eu Se	c tgt r Cys 105	ttc cac Phe His	act go Thr Ai	t ttc at a Phe Mo 110	lg ctc	336
	ttc tgc Phe Cys	atc ag ile Se 115	t gtc r Vai	acc a The A	ga ta rg Ty 12	r ren	gct atc Ala lle	gcc ca Ala Hi 12		c ttc g Phe	384
25	tat aca Tyr Thr 130	aag agg Lys Arg	g ctg g Leu	acc t Thr P	tt tg he Tri 35	acg Thr	tet ctg Cys Leu	gct gt Ala Va 140	g alc tg I lle Cy	t atg s Het	432
30	gig igg Val Trp 145	act ctg Thr Leu	351	gtg g Va! A 150	cc atg	gca Ala	tit ccc Phe Pro 155	ccg gt Pro Va	t ita ga I Leu Asi	g gtg Val	480
	ggc act (Gly Thr 7	ac tca yr Ser	ttc Phe 165	att a lie A	gg gag rg Glu	gaa g Glu /	gat caa Asp Gin 170	tgc acc Cys Thi	ttc car Phe Gir	His	528
35	cgc tcc t Arg Ser P	tc agg he Arg 180	gct :	aat ga Asn As	t tcc p Ser	tta g Leu G 185	ga ttt ily Phe l	atg ctg Het Leu	ctt ctt Leu Leu 190	gct Ala	576
40	ctc atc c Leu lie L	tc cta eu Leu 95	gcc a	ica ca	g ctt n Leu 200	gtc t Val T	ac ctc a yr Leu l	iag ctg ys Leu 205	lle Phe	ttc Phe	624
45	gtc cac ga Val His As 210	at cga sp Arg	aga a Arg L	aa at ys Me 21	g aag t Lys S	cca g Pro V	al Gin P			gtc Val	672
	age cag aa Ser Gin As 225	n Trp	ini P	tt cz he His	t ggt s Gly	cct gr Pro G	ga gcc a ly Ala S 235	gt ggc er Gly	cag gca Gin Ala	gct i	720
50	gcc aat tg Na Asn Tr	g cta p Leu .	gca g Ala G	ga ttl	gga Gly	agg gg	at cre a	ca cca	CCC acc		768

	cts	eg (: ato	ags	z caz	aat	gca	aai	caco	aca	ggo	aga	aga	ı agı	z cta	a ttg	816	
•				: Arg	Glr				The	Thr						u Leu		
				260) .				265				•	270)			
5	e t c	tta	. 026	730			1,,	, 636	, ,,,	272	aite	200	301	ate	. 110		864	
	Val	Leu	Aso	Glu	Phe	Lys	Mel	Gl	Lys	Are	110	Ser	Are	Mel	Phe	Tyr		
	•	•	275					280				,	285					
								•						:		Time:		
10																gcc	912	
	116	290		rne	Fen	гле	295		ren	irp	GIY	300	-	Leu	Yai	Ala	* 1	
	,						133					,					· .	
																ttt	960	
45			Trp	Arg	Val		Ala	Arg	Gly	Pro	_	Val	Pro	Gly	Gly	Phe		
15	305					310	1	,			315					320		
	cta	aca	ect	gct	etc	tee	ate	aet	ttt	PCC.	CAA	PC4	222	atc	aat	cct	1008	
•						Trp											,,,,,	
•					325	٠.		.*		330	•				335			
20						• • •	1						4-4				1055	
	Phe	Val	Cys	lle	Phe	Ser	Asn	Y L E	Cin	Leu	AFE	Arg	Cys	Phe	Sec	Thr	1056	
•				340		•		,	345				-, -	350	•••	****	, .	
-X-		.:	1			•								-				
<i>25</i>						aga Arg										tgt	1104	,
25	1 101	rén	355	131	UJS	VIR	112	360		LEU	riv	VIR	365	rio	ıyı	CA2		
									•				•			•		
*	gtt		tga				1		. 0			-	, · •				1113	
•	Val	370		٠.			1			•	:				• 6			
30		210				•						•						
*							1	•										
	<210						1	•										
Α.	<211 √212																	
35				apie	ens.		1						•					
							1											
	<400			_			Ĺ							-		_		
•	Net	Ala	ΑSΠ	Tyr	Ser	His	Kla.	Ala	Asp		He	Leu	Gln	Asn		Ser		
	•				7		1			10					15	·. ` .		
40	Pro	Leu	Thr	Ala	Phe	Leu	Lys	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Phe	He	lle	Gly	-	
•				20				•	25				٠.	30				
4	V-I	٠.,	V- 1	V_1	د ا ب	4				c				U_ 1				
•	141	361	35	121	GIY	Asn	Len	40	116	261	116	ren	45	184	Lys	v2b		
45								70					70					
	Lys	Thr	Lev	His	Arg	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Phe -	Leu	Leu	Asp	Leu	Cys	Cys		
. *		50	٠,				55					60				, .		
		1	11-	1	A	°	A .	11-	Cv	06.	D	Dh	V. 1	Db -	4		•	
	Ser 65	vsh	. 16	Leu	VIE	3er . 70	A: E	116	cy 5	rne	75	rne	181	rne	V2Ω	80 2er		
50																30		
	Val.	Lys	Asn	Gly	Ser	Thr	Trp	Thr	Tyr	Gly	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Val	. *	
				•	85	•	İ			90					95		*	

		le A	la Pi	he 1	en Cl	v Va	lle	: 11 Se	r	e Ph	a Hi	• T	· · · A I	. Di	 Galda	
					00				10			3 11	. * *	11		
	F	he C	ys I	le Se	r Va	1 Th	r Ar	g Ty	r Le	u Al	a	e Al	a Hi	s Hi	s Ar	g f
		*	. 11					12					12			
ا الله الله الله الله الله الله الله ال	Ţ	yr Ti	hr Ly	s Ar	g Le	u Th	r Ph	e Tr	p Th	r Cy	s Le			1 11	e Cy	5 A
			- T				, ,					. 14			i.	
		45	p Th	r Le	n 26	r Va 15	1 Ala 0	a Ne	t Ali	a Phi	Pro 159	Pr	o Va	l Le	u As	p \
	G	ly Th	r Ty	r Se	r Ph	e Hi	e Ari	, Gli	ı Gli	1 457	, CL	Cv	Th	e Dh		
					16	5				170)		5 11¢	i FA	17	
	A	rg Se	r Ph	e Ar	g Ala	a Asi	Asp	Ser	Lei	Gly	Phe	Me	Le	Let	ı Lei	ı A
				18	0				185			, t		. 190)	
	L	20	e Le	u Lei 5	Ala u	The	Gin	Leu 200		Tyr	Leu	Lys	Le:		Phe	P
	٧.	Lui	7	3			. Ha k			Val		D L -		11		×
		21	s Asi O	, VI	S VIE	r.T.	215		Pro	ASI	610	220		AIA	Ala	y
	Se	r GI	u Ası	ı Trp	Thr	Phe	His	Gly	Рго	Gly	Ala	Ser	Gly	Gln	Ála	A
	22	5				230			*		235			9		2
	Al	a Asi	Trp	Leu	Ala 245		Phe	Gly	Arg	Gly 250	Pro	Thr	Pro	Pro		
	0 1					·· ·				٠.			1		255	. :
		n (1)	/ ile	260	GIN	ASN	Ala	ASA	265	Thr	GIY	Arg	Arg	Arg 270	Leu	L
	Va	l Lei	Asp	Glu	Phe	Lys	Met	Glu	Lys	Arg	He	Ser	Arg	Met	Phe	T
		: .•. 	275					280	*	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •			285			
	H	e Met 290	Thr	Phe	Leu	Phe	Leu	Thr	Leu	Trp	Gly		Tyr	Leu	.Va I	A
							295		-			300				
	30!	s Tyr S	Trp	Arg	Val	Phe 310	Ala	Arg	Gly	Pro	Val 315	Val.	Pro	Gly	Gly	Ph 32
	Lei	1 Th <i>r</i>	Ala	Ala	Val	Tro	Wet	Ser.	Dhe	Ala		Ala	Clv	114	4	
			1. 1		325	,.,		-	, 11 C	330	G i ii	ΛΙΔ	ury	(16	335	
10	Pho	Yal	Cys	lle	Phe	Ser	Asn	Arg	Glu	Leu	Arg	Arg	Cys	Phe	Ser	Th
				340	-				345					350		
	Thi	Leu	Leu	Туг	Cys	Arg	Lys		Arg	Leu	Pro.	Arg		Pro	Tyr	Су
8	0		355	1944) 1445	• .			360			75.		365			
		11e			•								• •			

		,												1.5				٠	
	•		(21	0>	5														
	•				1122				70			•							
				2> 1		• •									•		•		
_		~				:						•							
5			(21	3) !	Homo	zapı	5112		•	. •									
					, '		•		. ` '	2				· .					
	•		(22	0>														,÷.	
			<22	1> (CDS			1						· .					٠.
			(22	2)	(1)	(111	9)												· • •
	-	1			REB3		••					٠.,			٠	÷		•	
10			. \	٠, ،	,,,,,,,,,		:					4					٠.	e ·	
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		- /	٠. ٠					•			ı			•				**
				0> 5											.5	*			
							acc												48
			Het	Ala	ı Asn	The	Thr	Gly	Glu	Pro	Glu	Glu	Val	Ser	Gly	Ala	Leu	Ser	
			``1				5		.:			10					15		
15				1	٠.	•								2.7		•		.0	. *•
			cca.	cca	tee	ora	tca	or t	tat	oto	220	cto	ota	cto	rto	003	cta	211	96
							Ser												
			rio	FIG	i șei			AIA	131	141		Leu	161	Leu	LED		Ļeu	116	
						20					25	. •				30			٠. ٠
20		1					ctg												144
0		• '	He t	Cys	Va!	Ser	Leu	Ala	Gly	Asil	SIA	He	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	
			14		35					40					45				
		•												• -				- 1	•
			225	020	rot	per	ctg	rar	220	ort	cet	tac	tac	tte	cto	cto	B36	cto	192
							Lev												132
	•		Lya		_	VIE	LEU	ш.э		VIE	FIU	171	131		FEA	rea	vab	Leu	
25	- 1			50					55			9		60					•
			*		•									•					
																		ctg	240
			Cys	Leu	Ala	Asp	Gly	He	Arg	Ser	Ala	Val	Cys	. Phe	Pro	Phe	Val	Leu	
			65				15	70			4.		- 75					80	
										• *		•					•		
<i>30</i>			ac t		010	ror	cac	901	tet	tra	100	200	ttc	a a t	913	ctc	2 P.C	tor	288
							His												200
	•		. 714	261	141	VIE		017	261	361	ijΡ			361	A I G	LÇU		Lys	
							85					90	•				95		
								٠.				100							
	•						ttt												336
35			Lys	He	Val	Ala	Phe	Me t	Ala	Val	Leu	Phe	Cys	Phe	His	Ala	Ala	Phe	
						100					105		•			110		• •	
				*													٠.		
			ate	cte	ttc	tec	atc	285	etc	acc	CEC	tac	ate	RCC	atc	gcc.	cac	CAC	384
	•						He												•••
	• -		RIG !		115	-13		361	TAL	120	~ 6	.,.	m G 1	N14	125	~14	.,		
40					113		•	· .		120		-			123				-
											- 14	A = =	4	A				- 4 -	144
	•		cgc																432
			Arg	Phe	Tyr	Ala	Lys	Arg	He t	Thr	Leu	Trp	Thr	Cys	Ala	Ala	Val	ite	
				130					135			٠.	•	140					
						9										•			
45			tgc	2 t o	err	too	acc	cto	tet	gto	gcc	ato	800	tte	CCA	éct	etc	ttt	480
-	•	٠.					Thr												
					VIS	עזו	1111			741	nid	mc t		, 112	110	110	741		
			145		•			150					155					160	
																	•		
							tac												528
EO	. •	7	Asp																
50				•			165	, -				170					175		
				•															**
		•				1 c -									b A -	- 4 -	- 4 4	- 4 -	676
			8 28	CAT	cgc	ISC	ttc	aag	gcc	155	gaç	acg	CIB	REC	ITC	arg	CII	a (g	576
														- "					

	GI	u Hi	s Ar			e Ly	s Al	a As	n As	p Th	r Le	u GI	y Pi	ne Me	et Lo	eu Met	
				18	Ų	ty'			18	3		, · . ·		. 19	90	- y . b .	
	tt	g gc	t gt	g ct	c at	g gc	a gc	t ac	ССЗ	t gc	t et	c ta	C 22	c aa	e ci	g ctc	. 6
	Le	u Ala	a Ya	I Le	u He	t Ala	a Äl:	a Th	r Hi	s Ala	a Va	I Ty	r GJ	y Ly	s Le	u Leu	
			19	5				200					20		1, 33		
					-1					7	1.		٠.				7.5
، نے پرست س	101	D Phi	e (!)	g la	Cg	Cac	cgo	2 3 3 5	3 2 2	3 328	Z CC	a gt	g ca	g at	ggt	g cca l Pro	67
		210)	,.		,	21:	j Ly. Š	, 166 (r F23		9 Va.	ינט ר	и ме	i va	1 Pro	
	111 × 1		* !-			1				•							
1	-BC	ato	: agc	Ca8	aac	tgg	aca	tto	cat	EE	CCC	888	gc	Cac	c gg	c cag	72
	VIS	1 116	: Ser	Gla	ı Ası	ı Trp	Thr	Phe	His	Gly	Pro	Gly	Al:	a Th	r GI	y Gin	
	225			-		230			1		235	i				240	
* * *	ect	ect	RCC	. 220	too	ato	000	øér				-			_	a cca	
	Ala	Ala	Ala	Asn	Trp	lle	Ala	Gly	Phe	Gly	Are	Glv	Pro	. ac	Per	Pro	76
**					245	; `	η,			250					255		
6										٠,			$\mathcal{M}_{\mathcal{L}_{\mathcal{L}_{\mathcal{L}}}}$				
111	The	Cig	CIE	SEC	310	cgg	Cag	aat	888	cat	gca	Scc	age	cgg	CES	cta	81
	7	Leu	FEG	260	1,15	VIE	. G i n	YZU	265	HIS	VIS	AIR	>er	270		Leu	
					. S.				- 777						50.5		i.
	ctg	SEC	atg	gac	gag	gtc	aag	ggt	gza	aag	cag	ctg	ggc	cgc	atg	itc	86
	Leu	Gly	Met	ASD	Glu	Val	Lys	Gly	Glu	Lys	Gin	Leu	Gly	Arg	Met	Phe	
			275		.5		-	280			4.7		285		ri.		
	tac	gcg	atc	aca	cte	ctc	111	cte	ctc	ete	tee	tca	cce	tar		gtg	014
	Tyr	TIY.	lle	Thr	Lev	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Trp	Ser	Pro	Tyr	lie	Val	31
*		290					295	- 3			• .	300		1			
		100		4					. 2 .					٠			
	Ala	tgc Cys	Tyr	Tro	Ara Ara	Vat	Phe	gig.	lve	gcc	Igt	gct	gtg	755	cac	cgc	960
	305					310				nie,	315	nia	741	FIO	D12	320	9
		1.5.		,	. •							0					
	tac	cig	gcc	act	gcl	gtt	tgg	atg	agc	tte	gcc	cag	gct	gcc	gtc	aac .	100
	131	Leu	Ala.	INF	A1 a	Yai	Irp :	He t			Ala	Gin	Ala	Ala		Asn	, .
* 6 2	٠		ile.		323	1				330				(335		
	cca	att	gtc	tgc	ttc	ctg	ctc	aac	aag	gac	ctc	222	aae	tec	cte	200	105
	Pro	ile:	A 9)	Cys	Phe	Leu.	Leu .	Aşn.	Lys	Asp !	Leu	Lys	Lys	Cys	Leu	Arg	
		in the	: C	340					345		•	· ••		350			
, r : -	act	CAC :	9¢¢.	i Céc			n a e		~~~				•				
100	Thr	His	Ala.	Pro 1	Cys	Tro (Giv	Thr (GIV (Civ :	gtt : Ala	Pro	gc t A i a	Pro	Ara	gaa	110
	*		355		•			360					365		~. B	310	
					. •						18 -	. · .					
	CCC	tac i	igt :	gtc	atg	tga	1	· 2				4 ·.		; ; .			112
	Pro	197 t 370	Lys .	va! !	He I	• •		1			1.	٠.				* *	
			· .					÷ ,				. 23					
	.,	`. <i>:</i>					*	-		1.5							
	(210)	> 6				``.		*					. ,		• :	• -	
	/2111	1 275					1				*						
	(211)						٠.	-1	8		•	- 1		:	٠.		

-		<4	00>	6	_								٠.				
		Мe	t Ala	a Ası	n Th	r Th	r GI: 5	y GI	u Při	o GII	Gla 10		l Se	r Gly	, Ala	Lei	Ser
		Pro	o Pro	s Sei	r Ala 20		r Ala	a Ty	r Val	l Lys 25		ı Va	Lei	Leu	G () 3(ille
o	• • •	Me	t Cys	35 35		r Le	u Ala	a Gly	y Asi 40		lle	Lei	ı Sei	Leu 45		Val	Leu
		Lys	G I u 50	i Arg	Ala	Lei	ı His	Ly:	_	ı Pro	Tyr	Tyr	Phe 60		Leu	Asp	Leu
5		Cys 65		Ala	Asp	ĞI	70	Arg	Ser	Ala	Val	Cys 75		Pro	Phe	Val	Leu 80
		Àla	Ser	Yai	Arg	Hi 1 85		Ser	Ser	Trp	Thr 90	Phe	Ser	Ala	Leu	Ser 95	Cys
0		Lys	He	Vai	Ala 100		Het	Ala	Val	Leu 105		Cys	Phe	His	Ala 110	Aia	Phe
		Net	Leu	Phe 115	Cys	110	Ser	Val	Th <i>r</i> 120		Tyr	liet	Ala	11e 125	Ala	His	His
5	; * · .	Arg	Phe 130		Ala	Lys	Arg	Me t 135		Leu	Trp	Thr	Cys 140	Ala	Ala	Vai	He
9		Cys 145	Met	Ala	Trp	Thr	Leu 150	Ser	Vai	Ala	Met	A1a 155	Phe	Pro	Pro	Val	Phe 160
**************************************		Asp	Val	Gly	Thr	Tyr 165	Lys	Phe	He	Arg	Giu 170	Gļu	Asp	Gin	Cys	11e 175	Phe
5		Glu	His	Arg	Tyr 180	Phe	Lys	Yla	Asn	Asp 185	Thr	Leu	Gly	Phe	We t 190	Lev	Met
¥.		Leu	Ala	Val 1 9 5	Leu	lie t	Ala	Ala	Thr 200		Ala	Va I	Tyr	Gly 205	Lys	Leu	Leu
) 		Leu	Phe 210	GI u	Tyr	Arg	His.	Arg 215	Lys	Met	Lys		Va I 220	GIn	Met	Val	Pro
,		A1 a 225	He	Ser	GIn	Asn	Trp 230	Thr	Phe	His	Gly	Pro 235	Glý	Ala	The	Gly	GI n 240
5		Ala	Ala	Ala	Aśn	Trp 245	lle	Ala	Gly	Phe	Gly 250	Arg	Gly	Pro	Met	Pro 255	Pro
,		Thr	Leu		Gly 260	ile	Arg	Gln	Asn	Gly 265	His	Ala	Ala	Ser.	Arg 270	Arg	Leu
*		Leu		Me t 275	Asp	Glu	Va 1	Lys	Giy 280	Glu	Lys	GIn	Lev	G1y 285	Arg	Met	Phe

	Tyr	Ala 290	He	Thr	Leu	Leu	Phe 295		Lei	Leu	Tre	Ser 300		Tyr	lle	Yal	
5	A1 a	Cys	Tyr	Trp	Arg	Val	Phe	Val	Lys	Ala		1		Pro	His	Arg	
	*	т, С.	Ala	Thr	Ala	310 Val		Net	Ser	Phe	315 Ala	Glo	Ala	Ala	Val	320	1. 1. 3.
10				·	325	أدلم		. .		330			1 1997	ا نام	335		<u>.</u>
	Pro	He.	Vai	Cys 340	Phe	Leu	Leu	Asn	Lys 345	Asp	Leu	Lys	Lys	Cys 350	Leu	Arg	
	Thr	His .	Ala 355	Pro	Cys	Trp	Gly	Thr 360	Gly	Gly	Ala	Pro	A12 365	Pro	Arg	Glu	
15	Pro	Tyr (370	Cys	Val	Met												
20	(210) (211) (212)	31 DNA				*											
25	(213) (220) (223)	X		- / .		t. Saatij	0	iai :	Sequ	ence	:For	ward	pri	ne <i>r</i>			
	<400> aaaat		a cg	cgal	BBCI	, aac	gcga	gcg	a							-	31
30	<210> <211> <212> <213>	31 DNA	ific	ial	Sequ	ence			0								
35	<220> <223>		· ·		· ·	٠.		a) S	eque	nce:	reve	rse	prim	er			
40	<400> aaaa to	8	0		٠. :	· . ·		*	1.				*				31
	<210> <211> <212> <213>	34 DNA	fici	al S	Sequi	ence				*							
45 .	<220> <223> <400>		ript	ion	of A	\rti1	licia	ıl Se	equei	ice:I	orwa	ard p	orime				
50	aaaa tc	taga	tct	atgg	cga	acta	tago	ca (gca								34
7.00	<210>	10			•			.*		· 1	· · · · .						

		<211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence	. •
5		<pre><220> <223> Description of Artificial Sequence:reverse primer</pre>	
10		<400> 10 aaaatctaga aaggctaaag atttacagat gctcc	35
		<210> 11 <211> 33 <212> DNA	
15	*	<pre><213> Artificial Sequence</pre>	
		<220> <223> Description of Artificial Sequence: Forward primer	
20		<400> 11 aaaatctaga gtatggccaa cactaccgga gag	33
		⟨210⟩ 12	
25		(211) 31 (212) DNA (213) Artificial Sequence	
		<pre><220> <223> Description of Artificial Sequence:reverse primer</pre>	
30	, e	<400> 12 aaaaatctaga cctgtctgcc taccagcctg c 3	11,
35		<210> 13 <211> 36	
	, 8.	<pre><212> DNA <213> Artificial Sequence</pre>	
40		<pre><220> <223> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope</pre>	
		<400> 13 atggactaca aggacgacga tgacaagggg atcctg 3	16
45		(210) 14 (211) 12	•
eX.		<pre><212> PRT <213> Artificial Sequence</pre>	
50	*:	<pre><220> <223> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope</pre>	
	* * *	<400> 14	

	Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly He Leu
<i>5</i>	⟨210⟩ 15
	(211) 32
	(212) DNA
للحد ما بخشا کو چم رو فیلید کلی در از از از از از	(213) Artificial Sequence
10	⟨220⟩
ري هي المواجع ورين حواجو وريسان الرياحة المواجع ورين حواجو وريسان	<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer
	2. <400> 15 (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)
15	aaaatctaga cggcgatggc gaacgctagt ga
	(210) 16
***	<211> 33 <212> DNA
	(213) Artificial Sequence
20	
	⟨220⟩
	(223) Description of Artificial Sequence: reverse primer
	<400> 16
25	aaaatctaga cactitgaga gtctigtgaa ggc
	(210) 17
	[⟨211⟩ 33]
30	<212> DNA <213> Artificial Sequence
	72137 Willicial Sequence
	⟨220⟩
	<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer
35	⟨400⟩ 17
	aaaatctaga tctatggcga actatagcca tgc
	⟨210⟩ 18
	(211) 35
10	(212) DHA
	(213) Artificial Sequence
	⟨220⟩
	(223) Description of Artificial Sequence:Forward primer
5	
	<400> 18
	aaaatctaga aaggctaaag atttacagat gctcc 35
0	⟨210⟩ 19
	<211> 34 <212> DNA
	(213) Artificial Sequence
· .	ing and the comparation of the contract of the

		•													•		7.42		
		<22	0>																
		(22	3> D	escr	int	ion	of A	rtif	icia	l Sei	ouen	e:r	ever.	se D	rine	r			
			., .								,								
5 .	•	CAN	0> 19	0	• •				75										
-			atct							a	***							34	
		004	8151	984	Laze		IE4 (EC. E.						1			77.	
٠.																* *			
	*	200									٠,				-				
			0> 20							•			•		•	8.7			
10			1> 34		_		·	*							•				
			2) DI		•		,· .		:		-								
	•	₹213	1,A <8	rtif	icia	il Se	quer	ice				•							
				•															
		<220	2>																
		<223	3> De	ser	ipti	on o	f Ar	tifi	cial	Sec	uenc	e:re	vers	e pr	ines	• ,	:		
15					•					٠.				•					
		<400)> 20	٠ ١			•												
	<i>,</i> ,	4	itcta		tott	99CC		otat	ee to	a to	a t						•	34	
			- 14	-	-0 * *		4		00,6										
•	***							-	-										
20		· (210	> 21			.•				٠.					•				
20			> 11					٠.										٠	
	- 1		> DN		٠.	•										-			
						-		0		•								. *	
		\213	> Ra	t tu:	2 2b	•			•		٠.					1.7	•		
		/000						- 4 +1		í.						٠,			
25	*	<220	-															•	
		(221				-		٠.		•	•								
	The state of the s		> (1)										•						
		(223	> Ra	t SF	REBI														
							**.					•						_	
		<400	-		٠.		•												
<i>30</i>	* .																gct	48	
	8	Met	Ala	Asn	Ala	Ser	Glu	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ğİv	Ala		
		: 1				5		-			10		_			15			
											. •					,			
		gcc	gcg	ctg	ggc	ctc	agg	ctg	gcc	aca	ctc	agc	ctg	ctg	ctg	tgc	gtg	96	
		Ala	Alal	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Val		
35					20					25	_		Š		30				
	1.1														•••			•	
		agc	cte	7 C F	ØØF	220	ota	cto	ttc	ect	cto	ete	ate	e t e	200	020	COC	144	
																	Arg	• • • •	
		001		35	0.,	V211	741		40	710		LUU		45	VI .	0.0	A1 6		
40			•	93					70					73	٠.				
	•				-4-		4			- 4 -	- 4					- 4 -		102	
	* •	agc																192	
		Ser		115	Arg	Ala	Pro		.lyr	Leu	Leu	ren		ren	Lys	Leu	VIS		
•			50	•				55					60						
		*							٠.	•									
45	-	gac																240	
	(4)	Asp	Gly I	_eu	Arg	Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Pro	Ala	Val	Me t	Leu	Ala			
		. 65					70					75					.80		
						,			•		•	•					•	-	
		cgg	cgc s	ZCZ	RCA	gcc	200	gce	222	acg	cct	CCZ	ggt	gc g	ctg	880	tec	288	
	•	Arg																	
50		5				85		,,,,	٠.,		90	- 1,0	,	4		95	7,0		
		, ,				9	•	*			-	. :	•						
	•	aag	c + c -								+ + -	100	+ + -					336	
	• 1	agg (- ig (. LK	RCC	116	cig	RCC	RcR	-11		. RC		Lac	8.8	Bet	,,,	220	

384 3 432 480
384 432 480
432 480
432 480
432 480
432
480
480
480
480
480
Y Y
528
10 10 1
576
4
624
924
1.
572
V
700
720
1. 16
768
768
768
768
768
768 816
816
816
816
816
816 864
816
816 864
816 864
816 864
816 864 912
816 864
816 864 912
816 864 912
816 864 912
816 864 912

		Ty	r Le	v Th	r Ala	325	_	Tr	Lei	t The	Phe 330		Gin	Ala	Gly	335	Asn	
5						Phe					Glu					Phe	aga Arg	1056
10	*				Pro					Pro					Ala		ctc Leu	1104
•				. Asp		aaa Lys			Gly						1		: .:	1134
15	* · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	₹21	0> 2 1> 3	77					**					•				
20	**	<21	2> P 3> R 0> 2	la t tu	s sp	•	∴ ≟			•				-				.)
	- 95 - 9-	Met 1	Ala	Asn		5	• •				10	· .	Gly Leu			15		*
25				Ala	20				Phe	25	.:		lle	Ya1	30			
30		Ser	Lev 50		Arg	Ala	Pro	Tyr 55	40 Tyr	Leu	Leu	Leu	Asp 60	45 Leu	Cys	Leu	Ala	
35	*	Asp 65	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu 70	Ala	Cys	Leu	Pro	Ala 75	Val	Met	Leu	Ala	A1a 80	
						85		. •	*.		90		Gly Phe			95		÷ 0
ю	* .				100					105	٠	•	Ala		110	•		•
15	*	Arg	Phe 130		Ala	Glu	Arg	Leu 135		Gly	Trp	Pro	Cys 140		Ala	Met	Leu	
		Va i 145	Cys	Ala	Ala	Trp	A12 150	Leu	Ala	Lev		Ala 155	Ala	Phe	Přo-		Val 160	
ю		Leu				165			•		170		Pro Phe	-		175	•	*
		J.11	W. 2		vah	J.,	n		J. 7	A16		J. J		FEN	ĻEU	FER	_60	

* *											•	. :				
		128	. ``	180			7	18	5		,		19	0		
					*		. / · .	* :								
5	Ala			Val G	ily A	la Th			u Ya	l Ty	r Le			u Le	u Phe	
			195		: :	37	201			- 1	4, 1,	20	5	ا دوره		
	Phe	lle F	lis A	sp A	rg Ai	g Ly	Me	t Ars	z Pro	Al	a Ar	e Le	u Va	i Pr	o Ala	
	3.	210				215					22		• • •	,	o nie	
·	- V-1				· · · · ·							T, ' <u>T</u>		- 4 		
10	225	SEL H	IIS A	so i	rp (n	ir Phe In	His	Gly	Pro			a Th	r GI	y GI	n Ala	1
				· · ·						23					240	
	Ala	Ala A	sn T	rp T	hr Al	a Gly	Phe	Gly	Arg	Gly	Pro	Th	r Pro	Pr	o Ala	
			'	24	45	j.		٠	250		*	30 y		25	_	
15	Leu	Val G	iv I	le A	ro Pr		Clv	Pro	Cly		. C1.		ý.			
	5 4		2	60		. 718		265		VIR	נוט	VI	270	Ar	g Fen	
									;	¹ -2						
	Leu	Vai L	eu G	lu Gi	u Ph	e Lys	Thr	Gln	Lys	Arg	Leu			Met	Phe	
20			75			·	280			1		285				
. 20	Tyr	Ala II	le Ti	ir Le	u Lei	u Phe	Leu	Leu	Leu	Tro	GİV	Pro	Tvr	Va (Val	,
		290			-	295		- 10			300				141	
	Ala	Car Tu			2 V2	3										•
	305	Ser Ty	I LE	יט אר	g val	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	Vaj	Pro	Glin		7 -
25				٠.			te.			313		17.			320	٠.
	Tyr t	ev Th	ır Ai	a Se	r. Val	Trp	Leu	Thr	Phe	A) a	Gin	Ala	Gly	He	Asn	.1
			,	32				¢.	330			,		335		
10 m	Pro V	al Va	I Cy	s Ph	e Leu	Phe	Asn	Are	Gla	Len	Aro	Åen	ru.	Dha	4	
30			34	0				345			nı g	nsp	350	rne	Arg	
	Ala C		, .: '										7 - 1		1 4	٠
	· Ala G	in Ph 35	e Pr	o Cy	s Cys	Gin	Ser	Pro	Gin	Ala	Thr		Ala	Thr	Leu .	
			•			7	300					365				
_	Pro C	ys As	p Le	u Lý:	Gly	He	Gly	Leu	0.		٠. ·			1.1		·
35	3	70				375	. :									
		• • •		-25.	•											
X 12	(210)	23			j I		*		0		,	; ·				
	(211)	1113						*	٠.			:1			, ,	
40	<212>	DNA							Y.,.				: :*		- 1	
	〈213〉	NALL	12 2t).						11.2		97 1				
	〈220〉			:						*						
	(221)	COS				$\dot{S}_{j}=0$		-								
45	〈222〉	(1)	(111)	0)	- 1							•		. ~	*	;
*	〈223〉	nal 3	KEBZ									201				
	〈400〉	23			٠	381			٠						· .	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	atg go	g 220	tat	agc	cat	gca g	getj	gac a	iàc a	itt :	ttg.	caa	aat i	ctc	tce	48
	Met Al	a Asn	.Tyr	Ser	His	Ala	Ala /	Asp A	(Sn	le i	Leu (Gln	Asn	Leu	Ser	. • ° ₹.,
50	İ			5		-			10	• •	6 . ··	· .	**	15	•	
	cct ct	a aca	RCE	111	cte	222 (i e	ict t	ee i	to .	79 t	tte	212		000	0.5
	Pro Le	u Thr	Ala	Phe	Leu	Lys l	eu	Thr S	er l	.eu (sa i	Phe	lle	lle	C}∧ PRa	95
													· · ·	· · ·	4	

20	•	- 25	4	30	ì
/U				- 31	ı
				• • •	•

			•													*		-30	
			gt	C ag	t ets	ets	2 220	. 220	e eti	t eti	g ati	e te	ali	tts	z cta	e e t	2 222	gat	144
5	*.																	ASP	•
•					35		•			40	_				45	5			
•	. •	-			٠.									1	•		•		
		٠.	238	3 400	: ttg	cat	aga	gcl	cct	tac	: tae	: ttc	: ctg	ctg	gat	cte	tgo	tgc	192
																		Cys	1
10	-		•	50)			• •	55	i		•	٠	60) .				
												:					•	• •	
• •	•			gac															240
1				Asp	He	Leu	ı Arg	Ser	, Ala	lle	: Cy:	Phe	Pro	Phe	Yal	Phe	Asn	Ser	
			65	·			٠.	70		٠			ृ 75			-		80	-
														1					•
15		*		828															288
			Vai	Lys	ASTI	Gly			Trp	inr	Tyr	Gly	Thr	Leu	Ipt	Cys			
	Ţ.					•	85	1				90		٠.			95		•
				gcc		- 1 -							-			442	- 4		•••
			lie	Ala	Pha	Lig	CIA	Val	lan	Ser	CAL	Dhe	ui.	The	AI.	Dha	atg	CIC	. 336
20	,			~! ~		100		141	LEU	361	105		111.9	1161	VIG	110	wet	FEO	÷
*			•	-	•	,,,,	٠.	٠.			,,,,	٠,							•
			ttc	tgc	atc	220	etc	300	828	tac	tta	RCC	atc	232	cat	cac	cec	ttc	384
				Cys															
	,				115		,		7	120			,	,	125				*
<i>2</i> 5									*					٠					
	•		tat	aca	aag	agg	ctg	acc	·111	tgg	acg	tgt	ttg	gct	gtg	atc	tgc	atg	432
			Tyr	Thr	Lys	Arg	Leu	Thr	Phe	Trp	The	Cys	Leu	Ala	Val	lle	Cys	Het	
			-	130					135					140					
				_		:				•									
30		- 4		tgg															480
				Trp	inr	Leu	Ser		Ala	Met	Ala	Phe			Vai	Leu	Asp		
			145				,	150					155					160	
			996	acc	tac	tea	***			<i>~</i> ~ ~	***	ا م			-				520
				Thr															528
35	•			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	.,,	001	165	116	V. F	010	3.0	170		0,3		1116	175	1113	
ω										•			•						
	•	*	cgc	tcc	ttc	222	gct	22C	gat	tcc	cta	222	ttt	ate	cte	ctc	ctt	ect	576
•	*			Ser															
		*				180					185					190		ŧ,	
															٠.		•	٠.	
40			ctc	atc	ctc	cta	gcc	aca	cag	ctt	gtc	tać	ctc	aag	ctg	ata	ttt	ttt	624
			Leu	He	Leu	Leu	Ala	Thr	Gin	Leu	Val	Tyr	Leu	Lys	Leu	He	Phe	Phe	:
	. '				195					200					205				
			• .	•														-	
				cac															672
45			Vai	His	Asp	Arg	Arg	Lys			Pro	Val	GIn			Ala	Ala	Val	
	• •		•	210					215					220				•	
	*						*				٠.								
			agt																720
				Gin	ASA	I rp			His	Gly	Pro	Gly		Ser	Gly	Gin	Ala		
50			225					230				•	235		•	•		240	
						2.4													
•				aat															768
	• .		. AIS	Asn	ILD	Leu	Ala	GIY	Phe	Gly	Arg	Gly	410	inr	rro	Pro	Thr	Leu	

	233
ctg ggc atc agg caa aat gcg aat acc aca ggc aga aga cgg	ctc ttg 8
aco and wall was the total and the city are are the	Leu Leu
270	
git tig gat gag tic ass ate gag and are ate and	
Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Are He Ser Are use	ite tat 8
275 280 285	iús il·À.L
ata arg act tic cic tic cta acc tig tgg ggt ccc tac ctg g	tg gcc 9
290 The Leu III Leu Irp Gly Pro Tyr Leu V	al Ala
tgc tat tgg aga gtt ttt gca aga ggg cct gta gta cca ggg ag	~~ ***
The second of the plant of the	gatti 96 Iv Pha
310	320
Cta aca pre get ate tan ate and a	
Leu Thr Ala Ala Vai Tro Met Ser Phe Ala Cla Ala Cla	it ccc 10
Phe Val Cye its the cor are agg gag cig agg ege tgt tte ag	c aca 10
340 ASH ASH AND LEU AND AND Cys Phe Se	r Thr
350	
acc cti ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct te	c +~+ 110
The transfer of the transfer at a left at a le	c tgt 110 r Cvs
360 365	
gtt ata tga	
Val 11e	111
370	
이 일을 하다니? 그렇게 얼마나면요? 이 나는 그들을 보니?	
(210) 24	
⟨211⟩ 370	
<212> PRT	
<213> Rattus sp.	
(400\ 24	
Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe ile lle	GIV
20 25 30	
Val Ser Val Val Cludes Landau Landau	
35 40 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Lai Lys	Asp
Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asa Lau Cua	Cue
Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys 50 60	Cys
Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys 50 55 60 Ser Asp He Leu Arg Ser Ala He Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn 65	
	git tig gat gag tic aga atg gag aga aga atc agc aga atg val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg lie Ser Arg Met P275 280 ata atg act ttc ctc ttc cta acc tig tgg ggt ccc tac ctg lie Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu V 230 tgc tat tgg aga git tit gca aga ggg cct gta gta cca ggg gCys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly G 305 cta aca gcc gct gtc tgg atg agt tic gcc caa gca gga atc ag Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gin Ala Gly lie As 325 acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg gag ctg agg cgc tgt tic ag Phe Val Cys lie Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Se 340 acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct ta Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Ty 355 gtt ata tga Val Ile 370 (210) 24 (210) 24 (211) 370 (212) PRT (213) Rattus sp. (400) 24 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lie Leu Gin Asn Leu 1 5 10 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe Ile Ile 20 25 30 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu ile Ser Ile Leu Leu Val Lys

			Val	Lys	Asn	Gly	Ser 85	Thr	Trp	Thr	Tyr	Gl y 90		Leu	The	Cys	Lys 95	Val
1			ile	Ala	Phe	Leu 100	-	-V21	Leu	Ser	Cys 105	Phe	Hi s	Thr	Ala	Phe 110		Leu
			Phe	Cys	 115		Val	Thr	Arg	Tyr 120		Ala	lie	Ala	His 125	His	Arg	Phe
o .			Tyr	Thr 130		Arg	Leu	Thr	Phe 135		Thr	Cys		Ala 140	Val	lie	Cys	Met
			Val 145		Thr	Leu	Ser	Va1 150	Ala	Met	Ala	Phe	Pro 155	Pro	Val	Leu	Asp	Val 160
5		÷	Gly	The	Tyr	Ser	Phe 165	lle	Arg	Glu	Glu	Asp 170	Gin	Cys	Thr	Phe	GIn 175	His
o		* ** *	Arg	Ser	Phe	Arg 180	Ala	Asn	Asp	Ser	Leu 185	Gly	Phe	Met	Leu	Leu 190	Lev	Ala
() ()			Leu	He	Leu 195	Leu	Ala	Thr	Gln	Leu 200	Val	Tyr	Leu	Lys	Leu 205	He	Phe	Phe
5			Val	His 210	Asp	Arg	Arg	Lys	Me t 215	Lys	Pro	Val '	GIn	Phe 220	Val	Aia	Ala	Val.
* *			Ser 225	Gin	Asn	Trp	Thr	Phe 230	His	Gly	Pro	Gly	Ala 235	Ser	Gly	Gin	Ala	Ala 240
o			Ala	Asn	Trp	Leu	Ala 245	Gly	Phe	Gly	Arg	Gly 250	Pro	Thr	Pro ·	Pro	Thr 255	
is 1			Leu	Gly	lle	Arg 260	Gin	Asn	Ala	Asn	Thr 265	Thr	Gly	Arg		Arg 270	Leu	Leu
5	,		Yal	Leu	Asp 275	Glu	Phe	Lys	lde t	G1u 280	Lys	Arg	lle		Arg 285	Met	Phe	Tyr
;			lle	He t 290	Thr	Phe	Leu	Phe	Leu 295	Thr	Leu	Trp	Gly	Pro 300	Tyr	Leu	Val	Ala
o .			Cys 305	Tyr	Trp	Arg	Val	Phe 310	Ala	Arg	Gly		Val 315	Val.	Pro	Gly	Gly	Phe 320
			Lev	Thr	Ala		Val 325	Trp	He t	Ser		330 41a	Gln	Ala	Gly		Asn 335	Pro
5	÷		Phe	Vai	Cys	11e 340	Phe	Ser	Asn		Glu 345		Arg	Arg		Phe 350	Ser	Thr
		÷	Thr	Leu	Leu 355	Tyr	Cys	Arg	Lys	Ser 360	Arg	Leu	Pro	Arg	G1u 365	Pro	Tyr	Cys
V			Val	11e 370						-	:						٠٠,	·.

					7,					(;		1.8					
		10>			10			-		1	4.			3 ***		. 1	, 4
			1122 DNA		15		1 . T	W .							ر در در در در در		
5				core	กรบ	F118									8 F		
	12		ver	6016	HAT	102.					1.00						
	(2:	20>	*	•		*			41 🕡		î. i	5. 35					
			CDS	ر انجاب سدا			<u> </u>		ا درست د			·	1	2 <u>. * '</u>			
				. (11	19)		i i			. ***.							
10	<22	23>	Rat	SREB	3			,									
نسأ الوارجة الكالوي أوأ الالجادات	رائين السيار والع		سانية	e e Gellerjaa		1,	, i .	د دهه پ				. : 2,				شاجيات شا	ا الوهيمة استراجه
	-	10>									`		- N	C	· ·		
	ats	BC	c as	c ac	c ac	C gg	a ga	g cc	c ga	a ga	g.gt	gag	c gg	C EC	a cti	g tcc	48
	MET	AT	a AS	u in	rin	r Gi	y. G11	y Pri	0 G1	u Gi	u Ya	I-Se	r Gly	/ Al:	a Lei	Ser	
15	•			-	: <u>;</u>	5				. [1]	ט	talia. Nati			* 1	5	
	cte	CC:	te	3 PC:	i tr	 	1 13		7. 22			~ ~ •				atc	0.0
	Leu	Pro	Se	Ala	Se	r Al:	a Tvi	Val	Ľv	Lei	r Va	r bij	, cu		i Dij	lle	39
The same of the sa				- 21)	V1.			2					3(Ler		7.
		٠.		r	: `		1		1.			,	0				· · . # ` `
20	atg	tgt	gt	age	ct	gc	gge	aat	gci	ate	: tt	tco	ctg	cts	gte	ctc	14
	Met	Cys	: Val	Sei	Le	ı Ala	Gly	Asn	i Ala	, He	: Lei	ı. Ser	Leu	Lei	Val	Leu	
			3	5				40)			. *	45				
						91 ₂		-	7	-	-			1			
	. lve	Ciu	CEI	gco	CU	cac	: 22g	gct	CCI	Tac	: tac	111	ctg	ctg	gac	ctg	192
?5	LJJ	50	i Aira	, Ale	LEC	, UIS	E E	A i a	PIC	171	ıyı	60		Leu	ASD	ren	
	orandra de la deservación de la deservación de la deservación de la deservación de la deservación de la deserv La deservación de la deservación de la deservación de la deservación de la deservación de la deservación de la		•		٠,		. "		1.7			,00		٠.	-		
	tgc	cta	gcc	gat	gg	ata	CEC	tct	RCC	ato	tec	ttc	ccc	ttt	eta	ctg	240
	Cys	Leu	Ala	Asp	Giy	He	Arg	Ser	Ala	He	Cys	Phe	Pro	Phe	Yal	Leu	270
	65					70				-:	75					80	
30			*. *	•			0	×+-		•						1.	* .
	gct	tct	gtg	CBC	cat	ggc	tee	tcg	tgg	acc	ttc	agt	gca	ctc	agc	tgt	288
	Ala	Ser	Val	Arg			Ser	Ser	Trp	The	Phe	Ser	Ala	Leu	Ser	Cys	
				1	85					90					95		:
15	220	att	ele	acr								44.	4			ttc	
	Lys	lle	Val	Ala	Phe	Met	Ala	Val	Len	Pho	CRC	Pho	180	geg	gcc	Dba	336
, T		•		100			ΛIΨ.		105		vys	1116	1113	110	AIG	rne	
*												• • •				4.	٠.
	atg	ctg	tite	tgc	atc	agc	gtc	acc	Cgc	tac	atg	gcc	atc	gcc	cac	cac	384
vo :	Met	Leu	Phe	Cys	He	Ser	Yal	Thr	Arg	Tyr	Het	Ala	He	Ala	His	His	
	9	٧	115					120					125		:		
				er (•		· .					
	CEC	ttc	tat	Scc	aag	cgc	atg	aca	ctc	tgg	aca	tgc	gca	gct	gtc	atc	432
	Arg		lyr	Ala	Lys	Arg		Thr	Leu	Trp	Thr		Ala	Ala	Val	lie	
5		130		· .		. "	135		٠			140					
	100												÷ 4				
	Cve	Met Met	Ala Ala	188	Th-	CCB	101	g(g	gcc	a ig	gct	TIC PL-	CC2	cct	gtc	ttt	480
	Cys (m∈ (A14	HP	anr	150.		721	A i Z	MEÇ		rne	710	71,0	YAI		•
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1.70	• •				130					155				· v	160	•
0	gat	RIE	220	acc	tar	225	111	atc	C 62	020	930	92¢	C S G	100	210	ttt.	220
*	Asp !	Val	GIV	The	Tvr	lvs	Phe	114	Aro	Gin	Clu	Par	Cla	CAG	114	Ph-	920
- 55																	,
· · · · ·			V		165					170					175		,

EP 1 067 183 A1

					,													
																	atg	576
=		611	ות ני	S Ar	g 191 180		e Lys	S Ali	a Asi	1 ASP 185		LEU	GIY	rne	190		Met	
5	*					,				103	,							
		ttg	ge	t gts	g cto	: át	gca	ge	caca	cat	gct	gtc	tat	ggc	aag	ctg	cta	624
	•	Let	s Ala		_	Me i	Ala	-A1a			Ala	Val	Tyr			Leu	Leu	
				19	5		:		200	١.				205	· ·	.*		
		cto		- 025	, tai	rol	F26			ato	220	cca	oto	cao	atσ	oto	CCC	672
10	2 0 mm 1 m											Pro						
			210					215			-•		220			, .	- 1	
_	•				•		*:	,										
												cct Pro						720
15	8	225		. 361	011	i Nau	230		1116	,,,,	017	235	017	A1 4		. Gry	240	
				•	٠.				٠.	, .								
	<i>y</i>																	768
		Ala	Ala	Ala	. Asn	1 Trp 245		Ala	Gly	Phe	G1y 250	Arg	Gly	Pro	Met	Pro 255	Pro	
20				•		243				<i>;</i> *.	ž JU					233		
																	cta -	816
		Thr	Leu				Arg	Gin	Asn		His	Ala	Ala	Ser		Arg	Leu	
		*		. •	260					265			٠.,		270			
~		ctg	ggc	atg	Rac	gag	gtc	226	ggt	gaa	226	cag	cte	RRC	cga	ate	ttc	854
25																	Phe	,
	•			275					280					285				
	•	tac	9EĐ	att	262	rtø	ctc	tte	ctø	ctc	ctc	100	tra	rr*	tac	211	gtg	912
	* .											Trp						
30			290					295		. 0			300	•	٠.		-	
	., 8 .						-1-						•	-4-				. 050
												tgc Cys						960
		305				_	310			_,,		315			• • • •		320	
35	**			•														
												gcc						1008
	*		LEU	Ala	187	325	481	IIP	met	ser	330	Ala	GIN	AIZ	AIZ	335	VZU	• ()
	**				٠,						•••		•				. '	
																		1056
40		Pro	He	Val		Phe	Lev	Leu	Asn			Leu	Lys	Lys	Cys 350	Leu	Arg	
	300			• •	340		,			345					350	e.		
		act	cat	gcc	cct	tğc	tgg	ggc	aca	gga	ggt	gcc	cca	gc t.	ccc	aga	gaa	1104
	* 1	Thr	His	Ala	Pro	Cys	Trp	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala	Pro.	Arg	Glu	
45	•			355					360					365	•		. *	
		cce	tac	tgt	a+-	9 6			•			• _						-1122
				Cys			184		•					•			٠.	-1166
			370	- , -	•		•	·		,					٠.	•	,	
50	·								•	•							•	
		/210	\ or	•											,	:		
,:) 26) 37		٠.												. • .	
	•	/611	, ,,	•	-								•					

66

EP 1 067 183 A1

-		<21	2> P	RT							y'. + ,	• •			· .		. + £ \(\frac{1}{2}\)
· 🔅 - 1		\21	3> R	at c	oron	avir	2.0			*	٠, .	٠, ١,		4 4	2 % - 10		
5		<40	0> 2	6	3.4		- ÷		-);		,						
					The	Thr - 5	Gly	Glu	Pro	Glu	G1 u	Vai	Ser	Gly	Ala	Leu 15	Ser
(4)		Leu	Pro	Ser	Ala	-Ser	Ala	Tyr	Val	Lys	Leu	Val	Leu	Leu	Glý	Leu	He
10		· Vary	2.44		20					25	: :		·		30	* * *	
ية لايا الأ	کی معمد از موجود داری در اداره در سید	Met	Cys	Val	Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	-11e	Leu	Ser	Leu	Leu	-Val	Leu
				35	9	1.6		, ,	40			- 1 - 1 - 1 - 1		45	`. ;!}'	ı.	,
15		Lys	Glu 50	Arg	Ala	Leu	His	Lys 55	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Phe 60	Leu	Leu	Asp	Leu
*		Cys 65		Ala	ASD	Gly	116	Arg	Ser	Ala	He	Cys 75	Phe	Pro	Phe	Val	Leu 80
											' <u>' '</u> :						,
20		Ala	Ser	Val	Arg	His 85	Giy	Ser	Ser	Trp	Thr 90	Phe	Ser	A/2	Lev	Ser 95	Cys
		Lys	He	Val	Ala 100	Phe	Met	Ala	Val	Leu 105	Phe	Cys	Phe	His	Ala 110	Ala	Phe
25		Met	Leu	Phe	Cys	lle	Ser	Val	The	Arg	Tyr	We t	Ala	He	Ala	His	His
			, 73 7	115					120	J	,			125			
		Arg	Phe 130	Tyr	Ala	Lys	Arg	Met 135	Thr	Leu	Trp	Thr	Cys 140	Ala	Ala	Val	He
30			Met	λŀa	Trp	Thr	Leu	Ser	Val	Ala	Ne t	Ala	Phe	Pro	Pro	Val	Phe
		145				•	150	<u>.</u>		. v	•	155					160
		Asp	Val	Gly	Thr	Tyr 165	Lys	Phe	He	Arg	GI u 170	Glu	Asp	Gin	Cys	11e 175	Phe
35		Giv	His	Arg	Tyr 180	Phe	Lys	Ala	Asn	Asp. 185	Thr	Leu	Cly	Phe	Me t 190	Leu	Met
		l én	Ala	Val	Leu	u	Ala		The	Hi e	Ala	Val	Tyr	Clv.	Lve	Lau	Lan
40			A I a	195		me i		, , , .	200					205	LJS	Leu	Leu
_		Leu	Phe	Glu	Tyr	Arg	His	Arg	Lys	Met	Lys	Pro	Val	Gin	Met	Val	Pro
			210			17 . 14	•	215		**			220				
45		Ala 225	lie	Ser	Gin	Asn	Trp 230	Thr	Phe	His	Gly	Pro 235	Gly	Ala	Thr	Gly	GI n. 240
		Ala	Ala	Ala		Trp 245	He	Ala	Gly	Phe	Gly 250	Arg	Gly	Pro	Het	Pro 255	Pro
				•		•	: . : .					V		ī		•	
50		Thr	Leu	Leu	G1y 260	He	Arg	Gin	Asn	G1 y 265	His	Ala	Ala	Ser	Arg 270	Arg	Leu
		Leu	Gly	Met	Asp	Glu	.Va.l	Lys	Gly	Glυ	Lys	Gin	Leu	Gly	Arg	lie t	Phe

275

-280

285

Tyr Ala lie Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr lie Val 290 295 300

Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg 305 310 315 320

Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gin Ala Ala Val Asn 325 330 335

Pro ile Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg 340 345 350

Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu 355 360 365

Pro Tyr Cys Val Met 370

25

15

Claims

- 1. A G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26, or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to said protein.
- 2. A G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26.
- 3. A gene which has a nucleotide sequence coding for the G protein-coupled receptor protein described in claim 1.

__

- 4. A vector which contains the gene described in claim 3.
- 5. A host cell which contains the vector described in claim 4. -
- 40 6. A method for producing the G protein-coupled receptor protein described in claim 1 or 2, or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to said protein, which comprises using the host cell described in claim 5.
 - 7. A method for screening a medicament acting on the G protein-coupled receptor protein described in claim 1 or 2, which comprises allowing said G protein-coupled receptor protein to contact with a compound to be tested.
 - 8. An antibody or a fragment thereof for the G protein-coupled receptor protein described in claim 1 or 2 or a partial peptide thereof.

50

45

55

FIG. 1

```
STEB 1 MANASEPGGSGGEAAALG---EKLATUSELLCVSDAGN 36
STEB 2 MANYSHAADNILONDSD--LTAFLKLTSLGFIIGVSVVGN 38
STEB 3 MANTTGEPEEVSGABSEPSASAYVKLVLGGIMCVSLAGN 40
  STEB 1 V L F A LL I V R E R S L H R A P Y Y L L L D L C L A D G L R A L A C L P A V M 76
STEB 2 L L I S I L L V K D K T L H R A P Y Y F L L D L C L A D G L R S A I C F P F V F 78
STEB 3 A I L S D L V L K E R A L H K A P Y Y F L L D L C L A D G L R S A V C F P F V L 80
 SREB 1 LAARRAAAAAAAA GAPPGALGCK LLAFLAALFCFHAAFLILGV 116
SREB 2 NSVKNGSTUTY---GTLTCK VIAFLGVLSCFETAFHLFCI 115
SREB 3 ASVEHGS SWTF---SALSCKIVAFHAVLFCFHAAFMLFCI 117
SEED 1 GVTRYLAIAHHRFYAERLAG WPCAAMLVCAAWALALAAAF 156
SEED 2 SVTRYLAIAHHRFYTKRLTFWTCLAV-ICNVWTLSVAMAF 154
SEED 3 SVTRYMAIAHHRFYAKRMTLWTCAAV-ICNAWTLSVAMAF 156
STEE 1 PPVLDGGG---DDEDAPCALEORPDGAPGALGFLLLLAVV 193
STEE 2 PPVLDVGTYSFIREEDQCTFQHRSFRANDSLGFHLLLALI 194
STEE 3 PPVFDVGTYXFIREEDQCIFEHRYFKANDTLGFHLMEAVL 196
SEES 1 V GATHLVYLELLEF I HDRRKHEPARL VPAVS HDUTEHGPG 233
SEES 2 LLATOLVYLKLIFF VHDRRKHEPVOF VAAVS ONUTEHGPG 234
SEES 3 MAATHAVYGKLLLEFYRHRKHEPVOHVPAIS ONUTEHGPG 236
SEED 1 ATGQAAANW TAGFGRGPTPPALVGIRPAGPGRGARRLLVL 273
SEED 2 A SGQAAANW LAGFGRGPTPPTLLGIRQNANTTGRRRLLVL 274
SEED 3 ATGOAAANW I AGFGRGPMPPTLLGIRONGHAASRR-LLGH 275
SREE 1 EEFKTEKRLCKMFYAVTLLFLLWGFYVVASYLRVLVRPG 3D SREE 2 DEFKMEKRISRMFYIMTFLFLTLWGFYLVACYWRVFARGP 314 SREE 3 DEVKGERQLGRMFYAITLLFLLWSPYIVACYWRVFVKAC 315
SKEB 1 A V.P.Q.A.Y.L.T.A.S.V.W.L.T.F.A.Q.A.G.I.N.P.V.V.C.F.L.F.N.R.E.L.R.D.C.F.R.A.Q.F. 353
SKEB 2 V.V.P.G.G.F.L.T.A.A.V.W.M.S.F.A.Q.A.G.I.N.P.F.V.C.F.L.N.K.D.L.K.K.C.L.R.T.H.A. 355
```

376 371

SEEB 1 PCCQSPRTTQATHP--CDLKGIGL SEEB 2 LYCRKS---RLPREPYC----VI SEEB 3 P-CWGTGGAPAPREPYC----VM FIG. 2

7.5-

heart

brain

placenta

lung

liver

skeletal muscle

kidney

pancreas

9.5-7.5-1.4-

spleen

thymus

prostate

testis

ovary

small intestine

large intestine

peripheral leukocyte

FIG. 3

2 4

amygdala

caudate nucleus

corpus callosum

hippocampus

whole brain

substania nigra

subthalamic nucleus

thalamus

cerebellum
cerebral cortex
medulla
spinal cord
occipital lobe
frontal lobe
temporal lobe
putamen

FIG. 4
7.5
1.4
1.4
1.4

heart

brain

placenta

lung

liver

skeletal muscle

kidney

pancreas

9.5-7.5-2.4-1.4-

spleen

thymus

prostate

testiš

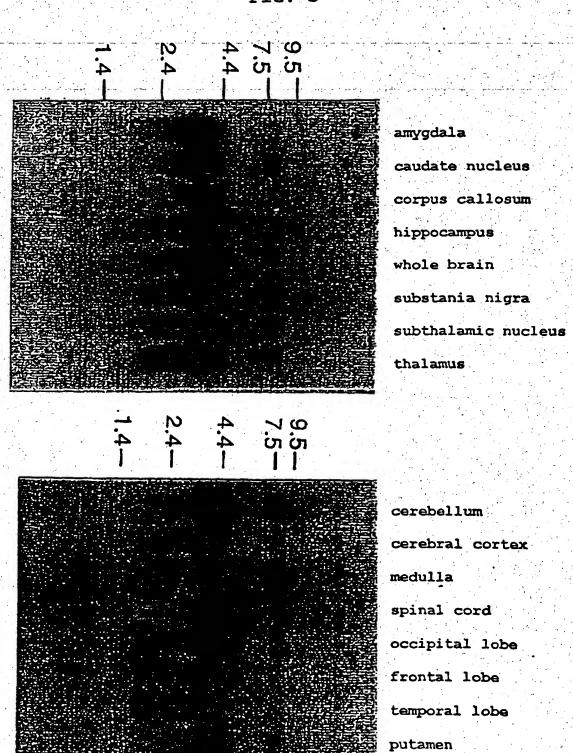
ovary

small intestine

large intestine

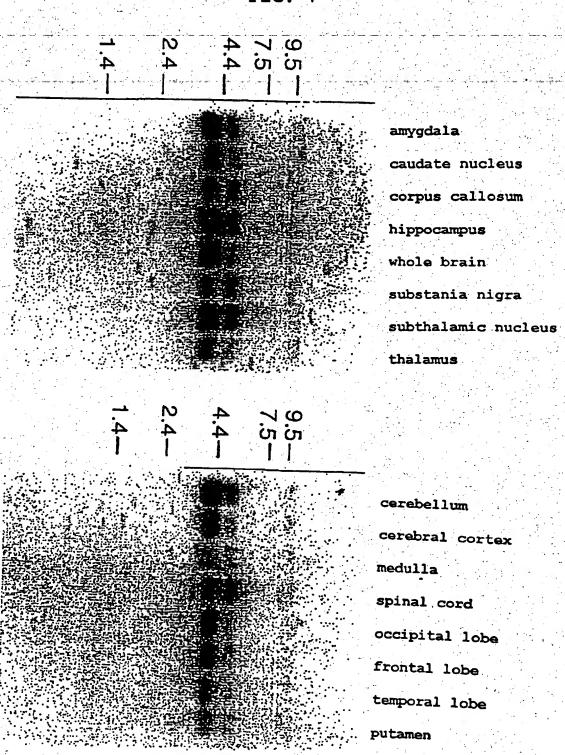
peripheral leukocyte

FIG. 5

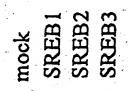


* * * * * * * * * * * * * * * * * * *		FIG	. 6				
1.4-	2.4	4.4-	7.5	D J	* -		
						heart	
3					1	orain	. × *
į					1	placenta	* (10)
						Lung	*
						liver	
						skeletal	muscle
					1	kidney	
					· .	pancreas	
	1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1		*	•			
-	N	4	7 9)			
1.4-	2.4	4.4	ပ် ပုံ	*			
						leen	<i>v)</i>
					100	ymus	
					. pr	ostate	, * ^{je}
					te	stis	
					*.	ary	
						all inte	
						rge inte	
			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•	per	cipheral	leukocyte

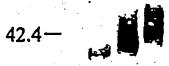
FIG. 7











30.3-

97.4— 66.2—

20.1

anti-FLAG



FIG. 10

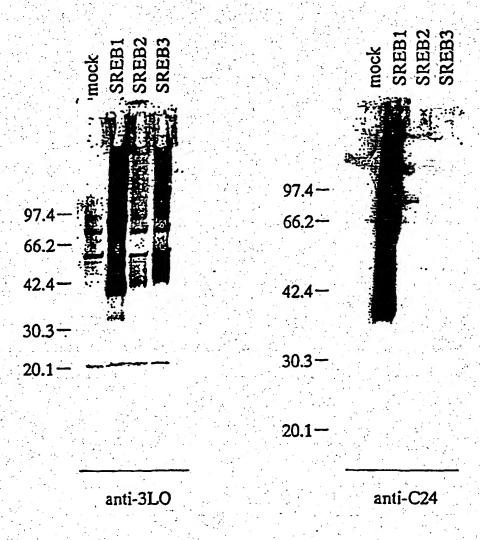


FIG. 11

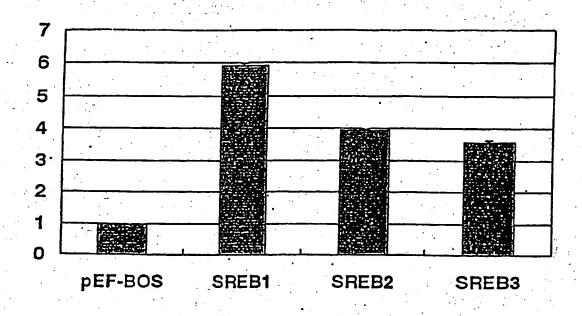
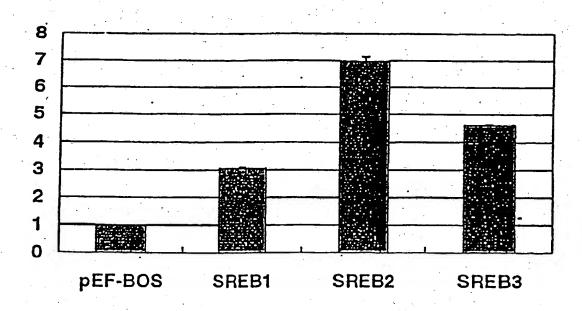


FIG. 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/01191

			101/0	133701131				
	SIFICATION OF SUBJECT MATTER .C1 C12N15/12, C07K14/705, C	12P2	1/02, C07K16/28					
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
	OS SEARCHED	Haute	I CIBSINGATION AND II C					
Minimum d	documentation searched (classification system followe	d by cl	assification symbols)					
Int.	.Cl C12N15/12, C07K14/705, C	12P2	1/02, C07K16/28	الم يعتلما المالية العالمات				
Documenta	tion searched other than minimum documentation to t	he exte	nt that such documents are includ	ed in the fields searched				
*		. 7						
Electronic d Gent	data base consulted during the international search (na Dank/EMBL/DDBJ/GeneSeq	une of	data base and, where practicable,	search terms used)				
		99.1 14.42	A. A. A. A. A. A. A. A. A. A. A. A. A. A					
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT							
Category	Citation of document, with indication, where a			Relevant to claim No.				
A .	US, 5508384, A (Univ. New Y 16 April, 1996 (16. 04. 96)	ork (Fa	State), mily: none)	1-8				
A (2)	The Journal of Neruoscience Guoping Feng et al., "Clonin characterization of a novel Drosophila melanogaster" p.3	ng an Dopa	nd functional amine receptor from	1-8				
λ	PEBS Letters Vol. 355 No. 3 Stephen Rees et al., "Clonin of the human 5-HTsa serotonin	g an	d characterisation	1-8				
Furthe	er documents are listed in the continuation of Box C.		See patent family annex.					
"A" documer consider "E" earlier d' "L" documer cited to apecial r documer means "P" documer the prior	categories of cited documents: cat defining the general state of the art which is not ed to be of particular relevance document but published on or after the international filing date ant which may throw doubts on priority claim(s) or which is establish the publication date of another citation or other reason (as specified) ant referring to as oral disclosure, use, exhibition or other ant published prior to the international filing date but inter than rity date claimed actual completion of the international search un , 1999 (15.06.99)	'T' 'X' 'Y' '&'	later document published after the inter- date and not in conflict with the applica- the principle or theory underlying the it document of particular relevance; the considered sovel or cannot be considered when the document is taken alone document of particular relevance; the considered to involve an inventive step- combined with one or more other such being obvious to a person skilled in the document member of the same patent of mailing of the international sea 22 June, 1999 (22.	stion but cited to understand invention datased invention cannot be and to involve an inventive step datased invention cannot be when the document is documents, such combination and				
	ailing address of the ISA/ nese Patent Offic		orized officer					